



Stimulation des lymphocytes T régulateurs chez la souris dans un contexte inflammatoire comme le diabète auto-immun.

Audrey Baeyens

► To cite this version:

Audrey Baeyens. Stimulation des lymphocytes T régulateurs chez la souris dans un contexte inflammatoire comme le diabète auto-immun. . Immunologie. Pierre et Marie Curie, Paris VI, 2013. Français. NNT: . tel-01240287

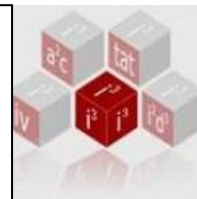
HAL Id: tel-01240287

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01240287>

Submitted on 9 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE DE SCIENCE

PRÉSENTÉE A

L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

ÉCOLE DOCTORALE : PHYSIOLOGIE et PHYSIOPATHOLOGIE

Par Audrey BAEYENS

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPÉCIALITÉ : IMMUNOLOGIE

Stimulation des lymphocytes T régulateurs chez la souris dans un contexte inflammatoire comme le diabète auto-immun.

Directeur de recherche : Benoît SALOMON

Co-directeur de recherche : Eliane PIAGGIO

Soutenue le : 5 juillet 2013

Devant la commission d'examen formée de :

M. Adrien	SIX	PU
M. Roberto	MALLONE	DR INSERM
M. Gilles	BLANCHO	PUPH
M. Olivier	BOYER	PUPH
M. Hans	YSSEL	DR INSERM
M. Benoît	SALOMON	DR INSERM
Mme. Eliane	PIAGGIO	DR INSERM

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse
Co-directrice de thèse

A mes parents et grands parents

REMERCIEMENTS

Après bientôt plus de 4 ans, c'est fini !! Je voudrais remercier particulièrement " mes deux chefs " pour m'avoir soutenu tout au long de cette thèse. Je me souviendrai toujours de la première fois où je suis arrivée dans ce laboratoire pensant " juste " faire une visite des pièces de cultures et me retrouver en entretien d'embauche de plus d'une heure avec vous deux (j'étais vraiment naïve). A la fin de cet entretien je vous ai demandé si vous étiez d'accord pour me prendre en stage ; et voilà c'était parti !!!

Benoît, un grand merci pour tout ce que tu as pu me transmettre, ton savoir, ton esprit critique qui ne trouve pas d'égal, ta compréhension et aussi pour la confiance que tu m'as accordée. Tu es toujours là en cas de besoin et tu sais rester à notre écoute même si parfois j'aurais bien fait des expériences sans ton accord. Merci aussi pour ta patience, car entre mes divers projets, mes fonctions de CME puis d'ATER et les corrections de mon manuscrit, ça n'a pas toujours été facile. On pourra dire que nous sommes devenus les rois des préparations de réunions de dernières minutes.

Eliane, ah ma Eli !! Comment te remercier, tu es juste géniale!! Tu m'as prise sous ton aile, telle une maman et tu as toujours été là dans les bons et les mauvais moments. Tu m'as appris à vraiment avoir confiance en moi, le jour où tu m'as dit " Ce projet IL-2 rapa c'est le tien, je te laisse carte blanche, fais-en ce que tu veux ". Tu m'as toujours épaulée et même recadrée quand j'avais des idées de manips bizarres. Les dimanches à travailler ensemble, les matés que l'on prenait vont me manquer.

Je remercie les membres du jury, à commencer par mes rapporteurs de thèse, Roberto Mallone et Gilles Blancho, qui ont accepté de consacrer une partie de leur temps précieux. Merci également à Oliver Boyer et Hans Yssel pour avoir accepté d'être mes examinateurs et de faire le déplacement. Merci aussi à Adrien Six de présider mon jury et d'avoir répondu positivement à ma demande si rapidement.

Je tenais aussi à remercier David Klatzmann de m'avoir accueilli dans son laboratoire dans lequel j'ai passé de réels bons moments. Merci aussi à tous les autres chefs, Bertrand, Gilles (le pro de STAT5), Michelle, Bruno, José, François...

Je remercie toute l'équipe enseignante d'immunologie de l'UPMC, Bertrand, Adrien, Véronique, Stéphanie, Julien, Sophie, Isabelle, Sébastien... Vous m'avez fait découvrir l'enseignement durant ces quatre années, encore vraiment merci pour cela.

Je tiens à remercier aussi mes petits étudiants, Maxouuu, Angéline... et particulièrement Louis ! Sans ton aide, je n'aurais jamais pu finir aussi vite le dernier papier. Je te souhaite une thèse brillante et d'être un futur Pr Herson ou Pr Piette, tu as tout ce qu'il

faut pour l'être ! Je voudrais aussi remercier celui qui m'a appris toutes les techniques du laboratoire et avec qui j'ai travaillé pendant plus de deux ans. Voilà Yenkel j'y suis arrivée !

Un énorme merci aussi aux "girls" du labo, p'tite Lea qui est magnifique avec son bidou, j'ai tellement hâte de le voir ce bout de choux !!! Ma petite Anne-So à qui je souhaite plein de bonheur au pays des kangourous, Sylvie la reine du tri, Gwladys ma compagnonne de galère, merci pour ton aide, ton sourire et nos fous rires, à quand la prochaine manip mystique ? Sans toi ces quatre années auraient été bien différentes !

Il y a aussi toutes les personnes qui font ou qui ont fait partie de ce laboratoire, pour leur bonne humeur et leur sourire au quotidien. Merci à Fabien (mon relecteur), aux TNT (Tristan et Thomas), Wahiba, Rodney, Soumia, Pierric, Bruno, Charlotte, Delphine, Guigui, Nathalie, Rachelle, Naomie, Sophie, Nico et Nico, Aude, Gaelle, Yvouille, Gegette, Claudio, Thomas, Martin, Manu, Béa, James (qui a pris un malin plaisir à me faire réaliser que j'étais en retard sur le manuscrit), Claude (mon superman), Andréa, les argentins Pedro, Gisela, Pablo, Dami et César avec qui j'espère continuer à garder le contact, l'équipe des Cordeliers Bertrand et Marie Christine, merci pour leur accueil...Et aussi tous ceux que je ne n'ai pas mentionné.

Je voudrais remercier particulièrement Tulio, mon amour, pour m'avoir accompagnée pendant toutes ces années et m'avoir supportée quand je n'en pouvais plus. Merci pour ton aide et tes relectures.

Enfin, mes plus grands remerciements vont à ma maman, à mon papa et à mon papy, pour m'avoir toujours soutenue dans mes études depuis toujours !!!!

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	4
RESUME	8
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	11
ABBREVIATIONS	12
INTRODUCTION	13
PREMIERE PARTIE : LA TOLERANCE IMMUNITAIRE	14
I : Principe de tolérance : le soi, le non soi	14
II : La tolérance centrale des lymphocytes T	14
A : La sélection des thymocytes	14
B : La présentation des antigènes du soi dans le thymus : le rôle de AIRE	15
III : La tolérance périphérique	16
A : Facteurs intrinsèques aux LT ou tolérance dite passive: ignorance, anergie et délétion	16
B : Les mécanismes extrinsèques ou tolérance active, implications de cellules spécialisées	17
1 : Les " Myeloid Derived Suppressive Cells " (MDSC)	17
2 : Les LT CD8 régulateurs	18
3 : Le rôle des lymphocytes B régulateurs	19
4 : Les Natural Killer T cells (NKT)	19
DEUXIEME PARTIE : LES LT REGULATEURS (TREG), UNE POPULATION CLE DE LA TOLERANCE	21
I : Mise en évidence et phénotype	21
A : Découverte et identification des Treg	21
B : Un facteur clé de la Tolérance : Foxp3	21
C : Autres marqueurs associés aux Treg	22
D : Et chez l'homme ?	23
II : Origines des Treg	24
A : Origine et différenciation thymique des Treg chez la souris	24
1 : Mise en évidence de l'origine thymique des Treg	24
2 : Le lieu de différenciation	24
B : Les signaux nécessaires à la génération des Treg dans le thymus	24
1 : Le rôle du TCR	24
2 : La transduction du signal TCR/CMH	26
2a : La voie NF- κ B et c-rel	27
2b : La voie PI3-Akt	27
2c : La voie NF-AT et AP-1	27
3 : Le rôle des cytokines dans le développement des Treg	27
3a : Le rôle de l'IL2, IL-15, et STAT5	27
3b : Le TGF- β	28
4 : Les molécules de co-stimulation	29
5 : Les autres facteurs régulateurs de Foxp3	29
C : Les Treg induits en périphérie	30
1 : Les Treg induits par l'IL-10 (Tr1)	30
2 : Les Treg induits par le TGF- β	31
D : La stabilité de l'expression de Foxp3	32
III: Les mécanismes de suppression exercés par les Treg	33
A : Les cytokines anti-inflammatoires	33
1 : L'IL-10	33
2 : L'IL-35	34

3 : Le TGF- β	34
B : La cytolysse directe des cellules cibles	35
C : Le blocage du métabolisme des lymphocytes T conventionnels	36
1 : La privation en IL-2	36
2 : Le métabolisme de l'ATP	36
D : La suppression de la réponse immunitaire via les DC	37
1 : Présentation des antigènes aux Tconv par les DC	37
2 : CTLA-4 et IDO	38
E : Dans quelles conditions et par quels moyens les Treg suppriment les Tconv ?	38
F : L'effet inhibiteur "Bystander"	39
G : "Le Classe contrôle"	40
IV : Homéostasie et modulation de la fonction suppressive des Treg	41
A : Activation et migration des Treg	41
1 : Activation des Treg	41
2 : Localisation, trafic et migration des Treg	41
2a : A l'état basal	41
2b : Dans un contexte inflammatoire	42
B : Le rôle de la famille γ C dans la survie des Treg	42
1 : IL-2 : facteur essentiel à la survie des Treg	43
2 : Rôle de L'IL-7, L'IL-15	45
C : Le rôle des DC et des pDC dans l'homéostasie des Treg	45
1 : les DC	45
2 : les pDC	47
D : Rôle de la famille CD28	48
1 : Le CD28	48
2 : La voie du CTLA-4	49
3 : La voie ICOS/ICOS-L	50
4 : La voie PD-1/PDL-1	52
E : La superfamille des récepteurs au TNF	53
1: Le TNF- α et les Treg	53
2 : OX40	55
3 : GITR	56
4: 4-1BB	57
5 : DR5	57
F : Une autre cytokine pro-inflammatoire : l'IL-1	58
G : Les signaux intracellulaires dans l'homéostasie des Treg	58
1 : La voie PI3K, Akt/mTOR	58
2 : les miRNA et les Treg	59
TROISIEME PARTIE : LE DIABETE DE TYPE I	61
Avant-propos	61
I : La physiopathologie du diabète	62
A : Le pancréas et le DT1	62
1 : Le pancréas	62
2 : Le DT1, une maladie auto-immune	62
B : Un modèle murin de DT1 spontané, la souris NOD	63
C : Les facteurs immunologiques responsables du DT1	64
1 : Les facteurs génétiques du DT1	64
1a : Les facteurs génétiques associés aux gènes du CMH	64
1b : Les principaux autres loci	65
2 : Les facteurs environnementaux	67
2a : La théorie de l'hygiène	67
2b : Effet du microbiote et d'autres facteurs	68
2c : Le diabète a-t-il une origine virale ?	69
D : Les principaux acteurs cellulaires du diabète	70

1 : Les cellules de l'immunité innée	70
1a : Le rôle des macrophages	70
1b : Les NK	71
1c : Les NKT	72
1d : Les cellules dendritiques	72
1e : Les neutrophiles	73
2 : Les lymphocytes B, et les anticorps anti-îlots	74
3 : Les T spécifiques du pancréas	74
4 : Le rôle des Treg dans le contrôle de l'auto-immunité	75
II : Les thérapies du diabète de type I	77
A : Les thérapies antigène-spécifiques	77
B : Les thérapies non antigènes spécifiques	79
1 : Les immunosuppresseurs classiques	79
1a : La cyclosporine A	79
1b : L'ATG	79
1c : Considération immuno-thérapeutique, la rapamycine	80
- Caractérisation	80
Mécanisme d'action, la voie de signalisation mTOR	80
Les cibles de la Rapa	80
L'effet thérapeutique de la rapa	81
2 : Autres biothérapies "plus récentes"	81
2a : L'antiCD3	82
2b : Le CTLA-4 Ig : abatacept et belatacept	83
2c : L'anti-CD20 : rituximab	83
2d : Le ciblage de l'IL-1	84
2e : Le TNF-α récepteur soluble	84
2f : Considération thérapeutique de l'IL-2	84
Caractérisation	84
Les récepteurs à l'IL-2	84
Le signal transduit par l'IL-2	85
L'effet thérapeutique de l'IL-2	86
C : Les thérapies cellulaires	87
1 : Les cellules souches hématopoïétiques	87
2 : Le transfert de cellules immunocompétentes	88
RESULTATS	89
PREMIERE PARTIE : INDUCTION DU " BOOST " DES TREG PAR LES TCONV	90
I : Contexte du projet I	90
II : Description succincte des modèles utilisés	91
A : Le modèle insHA	91
B : Les souris TCR transgéniques	91
III: Le " boost " des Treg dans l'auto-immunité	91
A : Description du " boost " des Treg induit par les Tconv pathogènes dans le DT1	91
B : Le rôle protecteur des Tconv diabétogènes	92
C : Etude du mécanisme du " Tconv → Treg boost "	92
1 : D'un point de vue cellulaire	92
2 : D'un point de vue moléculaire	92
IV : Le " boost Tconv → Treg ", dans un contexte de forte inflammation	93
A : Les Tconv activés favorisent l'expansion des Treg chez la souris BALB/C immunisée en CFA93	94
B : L'IL-2 est indispensable au « boost Tconv → Treg » chez la souris BALB/C	94
1 : D'un point de vue cellulaire	94
2 : D'un point de vue moléculaire	94
ARTICLE 1 ET ARTICLE 2	94

TABLE DES MATIERES

<i>DEUXIEME PARTIE : L'EFFET CURATIF DE L'IL-2 SEUL OU COMBINE AVEC LA RAPAMYCINE CHEZ LA SOURIS NOD.</i>	96
I : Contexte du projet II	96
A : L'IL-2 induit une rémission du diabète à long terme	96
B : L'effet de l'IL-2 sur la physiopathologie passe par les Treg	97
ARTICLE 3	97
C : L'effet d'une forte dose d'IL-2	98
D : L'IL-2 et la rapamycine chez la souris NOD	99
ARTICLE 4	100
 DISCUSSION	101
<i>PREMIERE PARTIE : ACTIVATION DES TREG PAR LES TCONV: UN NOUVEAU MECANISME DE RETROCONTROLE, LE " BOOST TCONV→TREG "</i>	102
I : Implications et " règles " du boost des Treg par les Tconv	102
II : L'augmentation de la proportion des Treg n'est-elle due qu'à l'effet du boost sur la prolifération des Treg ?	105
A : L'amplitude du " boost " des Treg	105
B : La spécificité antigénique	105
III : Les différences de mécanisme du " boost Tconv→Treg " selon les contextes inflammatoires	106
A : Les facteurs moléculaires	106
1 : L'IL-2 et le " boost Tconv→Treg "	106
2 : Le TNF- α	107
2a : Le TNF- α et la fonction suppressive des Treg	107
2b : La voie de signalisation TNF- α et NF- κ B	109
2c : Le TNF- α dans le diabète spontané de la souris NOD	110
3 : OX 40	110
B : Les facteurs cellulaires, l'implication des pDC	111
C : Les mécanismes possibles du boost des Treg	112
<i>DEUXIEME PARTIE : A LA RECHERCHE D'UNE THERAPIE DU DT1</i>	113
I : Le choix du modèle NOD	113
II : Le rôle des Treg comme cible thérapeutique du diabète	114
III : L'effet curatif de l'IL-2 chez la souris NOD, une question de dose !	115
A : L'IL-2 à faible dose	115
B : L'IL-2 à forte dose	116
IV : Dans un contexte actuel, les thérapies par l'IL-2	117
V : Vers des thérapies combinées	118
A : Effet de la combinaison IL-2 rapamycine sur le système immunitaire	118
B : La rapamycine a un rôle néfaste directement sur les îlots	120
VI : Vers de nouvelles thérapies	120
VII : Appréciation personnelle	121
 ANNEXES	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	125

Stimulation des lymphocytes T régulateurs chez la souris dans un contexte inflammatoire comme le diabète auto-immun.



83, bd de l'hôpital – 75651 Paris cedex 13.



Audrey BAEYENS

**Stimulation des lymphocytes T
régulateurs chez la souris dans un
contexte inflammatoire comme le diabète
auto-immun.**



Abstract

Regulatory T cells (Treg) play a major role in the regulation of immune response. We studied the impact of the activation of T lymphocytes (Tconv) on Treg homeostasis in 2 inflammatory environments: type 1 diabetes (T1D), and in adjuvant-induced inflammation. In these two contexts, we observed that Tconv have the capacity to increase the proliferation of Treg. We called this phenomenon the Tconv→Treg boost. Surprisingly, this Treg boost is partially dependent on TNF- α , in both contexts. Moreover, the Tconv→Treg boost is dependent on IL-2 in adjuvant-induced inflammation scenario, but not in T1D. These data show that Tconv could have a paradoxical immuno-regulating effect.

It has been established that IL-2 is essential for Treg homeostasis. In a model of non-obese diabetic (NOD) mice, low doses of IL-2 could cure T1D by increasing the proportion and suppressive capacity of pancreas-infiltrating Treg. Interestingly, higher doses of IL-2 accelerate the incidence of T1D. With the aim to improve the curative effect of IL-2 (low-dose), we combined this treatment with an immunosuppressive drug, rapamycin (rapa). Unexpectedly, rapa inhibited the therapeutic effect of IL-2. It seems that this drug alters both suppressive capacity and the migration of Treg into the pancreas, as well as it has a deleterious effect on glucose homeostasis at multiple levels. These findings reinforce the idea for the implementation of a clinical trial testing low-dose IL-2 to T1D patients, boosting their own Treg. On the other side, it is important to highlight that understanding the limitations of IL-2 and rapa in immunotherapy of T1D should allow the design of safer and optimized clinical trials for T1D treatment.

Keywords :

Regulatory T cell, autoimmunity, inflammation, diabetes, interleukin-2, rapamycin.

I³ : Immunologie-Immunopathologie-Immunothérapie.

CNRS-UPMC UMR 7211, INSERM U959. CERVl,

Hôpital de la Pitié Salpêtrière

83, bd de l'hôpital – 75651 Paris cedex 13.

LISTE DES FIGURES

Figure 1. La différenciation thymique	15
Figure 2. Modèle de sélection thymique	15
Figure 3. Schéma simplifié des divers mécanismes de tolérance passive vers l'activation du système immunitaire	16
Figure 4. Modèle représentant la probabilité de sélection des Treg thymiques basée sur l'affinité	25
Figure 5. Modèles proposés de la différenciation thymique des Treg	25
Figure 6. Les Facteurs impliqués dans la régulation de l'expression du gène Foxp3 dans le thymus	27
Figure 7. Schéma simplifié des facteurs participant à l'induction des différents Treg en comparaison avec les Treg d'origine thymique	30
Figure 8. Différents facteurs induisant l'expression de Foxp3 dans les Treg issus du Thymus ou induits à la périphérie	31
Figure 9. Mécanismes de suppression exercés par les Treg	34
Figure 10. Le "classe contrôle"	40
Figure 11. Circulation des Treg pendant la réponse immune	41
Figure 12. Récepteurs de la famille γC	43
Figure 13. Le rôle des pDC tolérogènes dans l'homéostasie des Treg	46
Figure 14. Comparaison de l'expression du CTLA-4 selon l'état d'activation des LT	49
Figure 15. Le rôle positif de la voie ICOS/ICOS-L sur les Treg dans le DT1	51
Figure 16. Voie de signalisation du TNFR-1 et TNFR-2	54
Figure 17. Récepteurs et voies de signalisations activés par les TNFRSF dans les LT	55
Figure 18. Structure du pancréas et production d'insuline chez l'homme	62
Figure 19. Représentation des différents loci génétiques jouant potentiellement un rôle dans le DT1	65
Figure 20. Nouveaux cas de diabète de DT1 répertoriés dans le monde, chez les enfants de moins de 14 ans, en 2011 et comparaison avec l'incidence de diarrhée chez l'enfant	67
Figure 21. Schéma représentant les facteurs environnementaux	68
Figure 22. Représentation schématique de l'effet inducteur ou protecteur des virus sur l'induction du DT1	69
Figure 23. Interaction entre les cellules immunitaires et les cellules β	71
Figure 24. Mécanisme cellulaire et moléculaire du développement ou de la prévention du DT1	72
Figure 25. Voies de signalisation ciblées par la rapamycine	80
Figure 26. Proposition du mécanisme d'action de l'anti-CD3 teplizumab et oteplizumab	82
Figure 27. Récepteur à l'IL-2	84
Figure 28. Schéma simplifié des voies de signalisation induite par l'IL-2	85
Figure 29. Fonctionnement des différents IL-2 complexes, chez la souris	86
Figure 30. Représentation des cibles thérapeutiques de la voie de l'IL-2	87
Figure 31. Mécanismes supposés du "boost" des Treg selon les conditions inflammatoires	111
Figure 32. Schéma comparatif des effets de l'IL-2 en comparaison avec les effets de l'IL-2 combinée à la rapamycine dans le DT1 chez la NOD	119

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Variabilité phénotypique des LT CD8 régulateurs	18
Tableau 2. Liste non exhaustive des différents marqueurs des Treg.	22
Tableau 3. Développement de la pathologie des souris C57/Black 6 IL-2R $\beta^{-/-}$	43
Tableau 4. Récapitulatif non exhaustif de l'effet du TNF sur les Treg et les Tconv chez l'homme et la souris dans l'auto-immunité	53
Tableau 5. Liste non exhaustive des essais thérapeutiques non antigène spécifique chez l'homme	79
Tableau 6. Liste non exhaustive des différents traitements à l'IL-2 chez la souris NOD	87
Tableau 7. Description comparative du “boost Tconv→Treg” lorsque les LT sont spécifiques d'antigènes endogènes ou exogènes	105
Tableau 8. Récapitulatif de l'effet de l'IL-2 à différentes doses sur le système immunitaire chez la souris NOD	117

ABBREVIATIONS

ADCC (antibody dependent cell cytolysis)	LFA-1 (Leukocyte Function- associated-Antigen 1)
AICD (Activation Induced Cell Death)	LT (Lymphocytes T)
AIRE (Auto-Immune REgulator)	M-CSF (Macrophage Colony Stimulating Factor)
Akt (protéine Kinase B)	MDSC (Myeloid Derived Suppressive Cells)
AMP (Adenosine Mono Phosphate)	MOG (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein)
APC (Cellules Présentatrices d'Antigènes)	MODY (Maturity Onset type Diabetes of the Young)
APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal-Dystrophy)	mTEC (cellules épithéliales thymiques médullaires)
Bcl2 (B-cell leukemia protein-2)	NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cell)
CBM (CARMA1, BCL-10, MALT1)	NF-κB (Nuclear Factor κ B)
CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité)	NK (natural Killer)
CNS (Conserved Non-coding Dna Sequences)	NOD (Non Obese Diabetic).
cTEC (Cellules Epithéliales corticales Thymiques)	NRP-1 (la neuropiline-1)
CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigene 4)	OVA (OVA Albumine)
DC (Cellules Dendritiques)	PD-1 (Programmed Cell Death 1)
DN (double négatif)	pDC (plasmacytoïde Dendritic Cell)
DP (double positif)	PI3K (phosphatidyl-inositol 3-kinase)
DT1 (diabète de type I)	PKC θ (protéine K C θ)
EAE (Encéphalomyélite Auto-immune expérimentale)	PLCγ1 (phospholipase C γ 1)
FAS (Apoptosis Stimulating Fragment)	PPAR-γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ)
Flt3-L (Fms-Like Tyrosine 3-Ligand)	PTEN (Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN)
FOXO (Forkhead box protein O)	RA (Acide Rétinoïque)
Foxp3 (Forkhead box protein 3)	RIP (Rat Insulin Promotor)
GARP (Glycoprotein A Repetitions Predominant)	SEP (sclérose en plaques)
GFP (Green Fluorescent Protein)	STAT (Transducers and Activators of Transcription)
GITR (Glucocorticoid Induced TNF Receptor)	Tconv (LT conventionnels)
GrB (granzyme B), Pfr (Perforine)	TCR (T Cell Receptor)
GvH (Graft versus Host) GvHD (Graft versus Host Diseases)	TDSR (Treg-specific Demethylated Regions)
HA (Hémagglutinine)	TGF (Tumor growth factor)
HCV (virus de l'hépatite C)	TLR (Toll Like Receptor)
HEL (Hen Egg-white Lysozyme)	TNF-α (Tumor necrosis Factor α)
HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1)	TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)
IBD (Induced bowel Diseases)	Treg (LT régulateur)
ICER (Inducible CAMP Early Repressor)	Th (T helper)
ICOS (Inducible Co-stimulator)	WT (wild Type) type sauvage
IDD (Insulin Dependent Diabetes)	YFP (Yellow Fluorescent Protein)
IFN-γ (Interféron- γ)	
IL (Interleukine)	
IPEX (Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked)	
IRF-4 (Interferon Regulatory Factor 4)	
LAT (Linker Activated T cells)	
LB (lymphocytes B)	
LCMV (Lymphocytic Chorio-Meningitis Virus)	

INTRODUCTION :

Première partie : La tolérance immunitaire.

I : Principe de tolérance : le soi, le non soi.

La fonction principale du système immunitaire est l'élimination ou le contrôle des agents pathogènes. Cette fonction n'est effectrice qu'au prix d'une inflammation, source de destruction tissulaire et parfois de réactivité contre des auto-antigènes. La mise en œuvre de processus de contrôle visant à préserver l'intégrité de l'organisme est essentielle. L'ensemble de ces processus fait partie du concept de "tolérance immunitaire". Celui-ci fut théorisé en premier par Paul Ehrlich au début des années 1900. Il pensait que le système immunitaire était incapable d'exercer une réponse contre le soi, ce qu'il appelait "l'horror autotoxicus" (*Wing and Sakaguchi, 2010*). Bien qu'incorrect, ce concept a permis l'élaboration de plusieurs théories dérivées, comme la théorie de la "sélection clonale" de Frank Burnet où les clones auto-réactifs sont éliminés dans le thymus de façon prématurée. Ou plus récemment la théorie du danger de Polly Matzinger qui préconise que le système immunitaire serait réactif aux seuls signaux de danger et n'aurait pas pour rôle de distinguer le soi du non soi (*Matzinger, 1994*). La tolérance a deux composantes : la tolérance centrale, agissant au cours de la différenciation des lymphocytes et la tolérance périphérique ayant lieu dans le reste de l'organisme.

II : La tolérance centrale des lymphocytes T (LT).*

A : La sélection des thymocytes.

Le premier rempart à la formation de lymphocytes T (LT) auto-réactifs est la sélection thymique. Elle se fait au cours du développement des LT au sein du thymus, constitué de deux zones : le cortex et la médulla. De façon résumée (**Figure 1**), les précurseurs T issus de la moelle osseuse vont être recrutés dans le thymus. Dans un premier temps, ils vont séjourner dans le cortex, y réarranger les segments V(D)J de leur "T cell receptor" (TCR) (du stade double négatif (DN) à double positif (DP)), et vont franchir plusieurs étapes de sélection. A ce stade les LT vont subir la sélection positive basée sur la reconnaissance du complexe peptide-complexe majeur d'histocompatibilité (p-CMH) autologue présenté par les cellules corticales thymiques (cTEC) (*Cosgrove et al., 1992*). Les thymocytes qui présentent une trop faible

* : La tolérance centrale s'effectue à la fois sur les LB et les LT or mon travail de thèse ne portant que sur les LT, dans la suite de cet exposé j'aborderai uniquement la tolérance centrale de ces cellules.

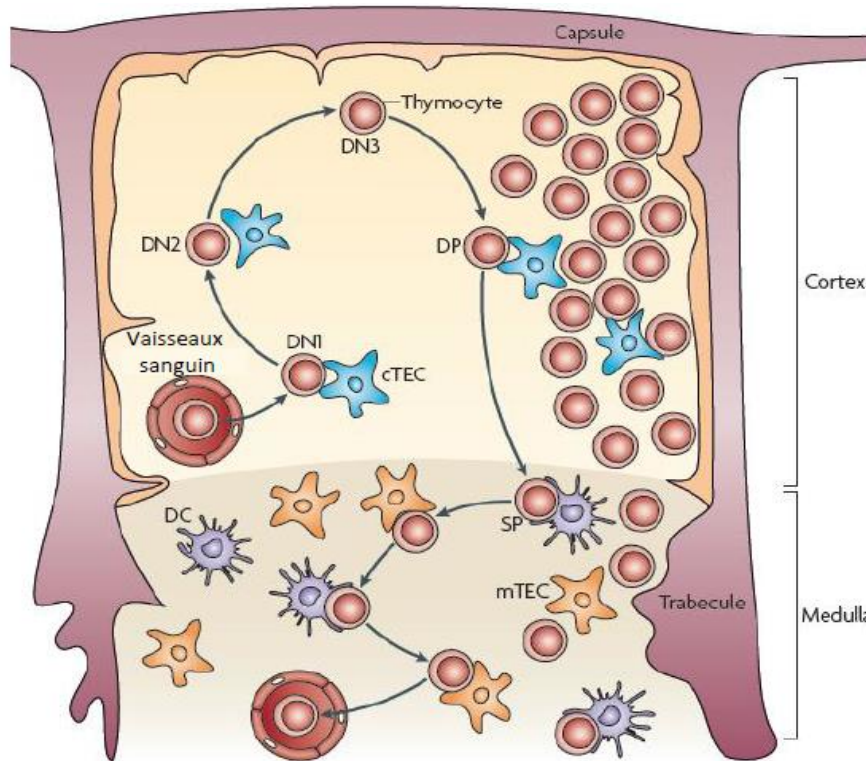


Figure 1. La différenciation thymique. mTEC = cellules épithéliales thymiques médullaires, cTEC = cellules épithéliales thymiques corticales. DC = cellules dendritiques. DN1, DN2, DN3 = stades double-négatif 1, 2, 3. DP: stade double positif. SP = stade simple positif. Les précurseurs thymiques vont séjourner dans un premier temps dans le cortex, y réarranger leur segments V(D)J et entrer en contact avec mes cTEC jusqu'au stade DP où ils vont subir la sélection positive. Les thymocytes vont migrer dans la médulla, entrer en contact avec les DC ou les mTEC et subir la sélection négative. Après ces étapes de sélection faites les thymocytes SP vont diffuser à la périphérie. Issu de (Klein *et al.*, 2009).

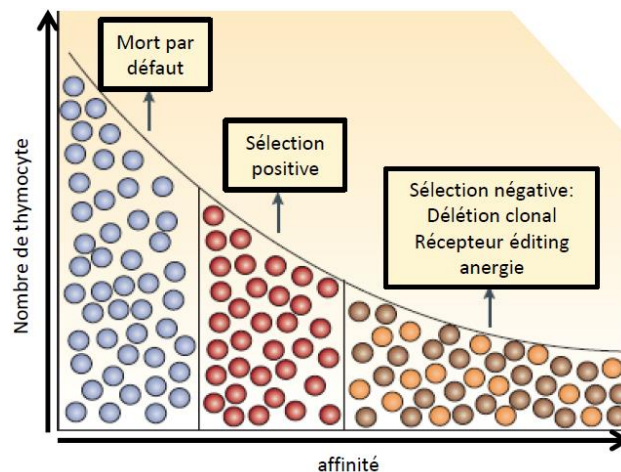


Figure 2. Modèle de sélection thymique. Le nombre de thymocytes diminue fortement au cours des différents processus de sélection. Une première partie des thymocytes meurent spontanément, une autre au cours de la sélection positive, puis une dernière pendant la sélection négative. Lors de la dernière étape de sélection les thymocytes peuvent échapper à la sélection en devenant anergiques ou en modulant leur TCR. Adapté de (Hogquist *et al.*, 2005).

affinité pour le CMH meurent par apoptose (*Klein et al., 2009*). Une fois la sélection positive passée, les thymocytes vont subir la sélection négative, visant à éliminer les lymphocytes reconnaissant trop fortement les peptides du soi. Si les thymocytes interagissent trop intensément avec les cellules épithéliales thymiques médullaires (mTEC) (*Gallegos and Bevan, 2004*) ou les cellules dendritiques présentant le complexe p-CMH, ils meurent par apoptose (*Klein et al., 2009*). A cette étape plus de la moitié des thymocytes sont éliminés, il s'agit de la sélection négative, également appelée délétion clonale (*Hogquist et al., 2005*) (**Figure 2**). Cependant, il existe des alternatives pour les thymocytes reconnaissant fortement le p-CMH: ils peuvent devenir anergiques, ou s'orienter vers une voie régulatrice.

B : La présentation des antigènes du soi dans le thymus : le rôle de AIRE.

La sélection négative est un moyen de défense crucial contre l'auto-immunité. Ce mécanisme repose principalement sur l'expression des auto-antigènes par les mTEC ou par les cellules dendritiques (DC) (*Derbinski et al., 2001*). L'expression ectopique de ces auto-antigènes comme l'insuline 2 est principalement contrôlée par un facteur de transcription: "Auto-Immune REgulator" (AIRE) (*DeVoss et al., 2006; Hou et al., 2009*). Une mutation du gène codant pour ce facteur se manifeste par un syndrome auto-immun l'APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal-Dystrophy) chez l'homme, (*Nagamine et al., 1997*) ou un syndrome auto-immun généralisé chez la souris (*Anderson et al., 2002*). Le groupe de Christophe Goodnow a démontré que ce syndrome est la résultante d'un défaut de sélection négative. Il montre que dans des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique d'un antigène modèle "Hen Egg-white Lysozyme" (HEL) sous l'expression du promoteur de l'insuline, les LT spécifiques de HEL sont éliminés. En revanche si ces mêmes souris sont déficientes pour AIRE, les clones spécifiques de HEL sont retrouvés à la périphérie (*Liston et al., 2004*). Le mécanisme moléculaire de l'expression ectopique de AIRE reste encore débattu, mais il semble que l'expression de ce facteur de transcription dans les cellules mTEC soit particulière, c'est-à-dire mono-allélique, alors que dans les tissus périphériques l'expression se fait de façon bi-allélique (*Danso-Abeam et al., 2011*). En plus du thymus, AIRE serait exprimé par un très faible nombre de cellules dans les organes lymphoïdes secondaires. Ceci pourrait là aussi permettre une expression d'antigènes tissus spécifiques et de supprimer certains LT auto-réactifs (*Gardner et al., 2008*). Cependant, AIRE n'est pas le seul facteur de transcription responsable de l'expression ectopique d'antigènes car

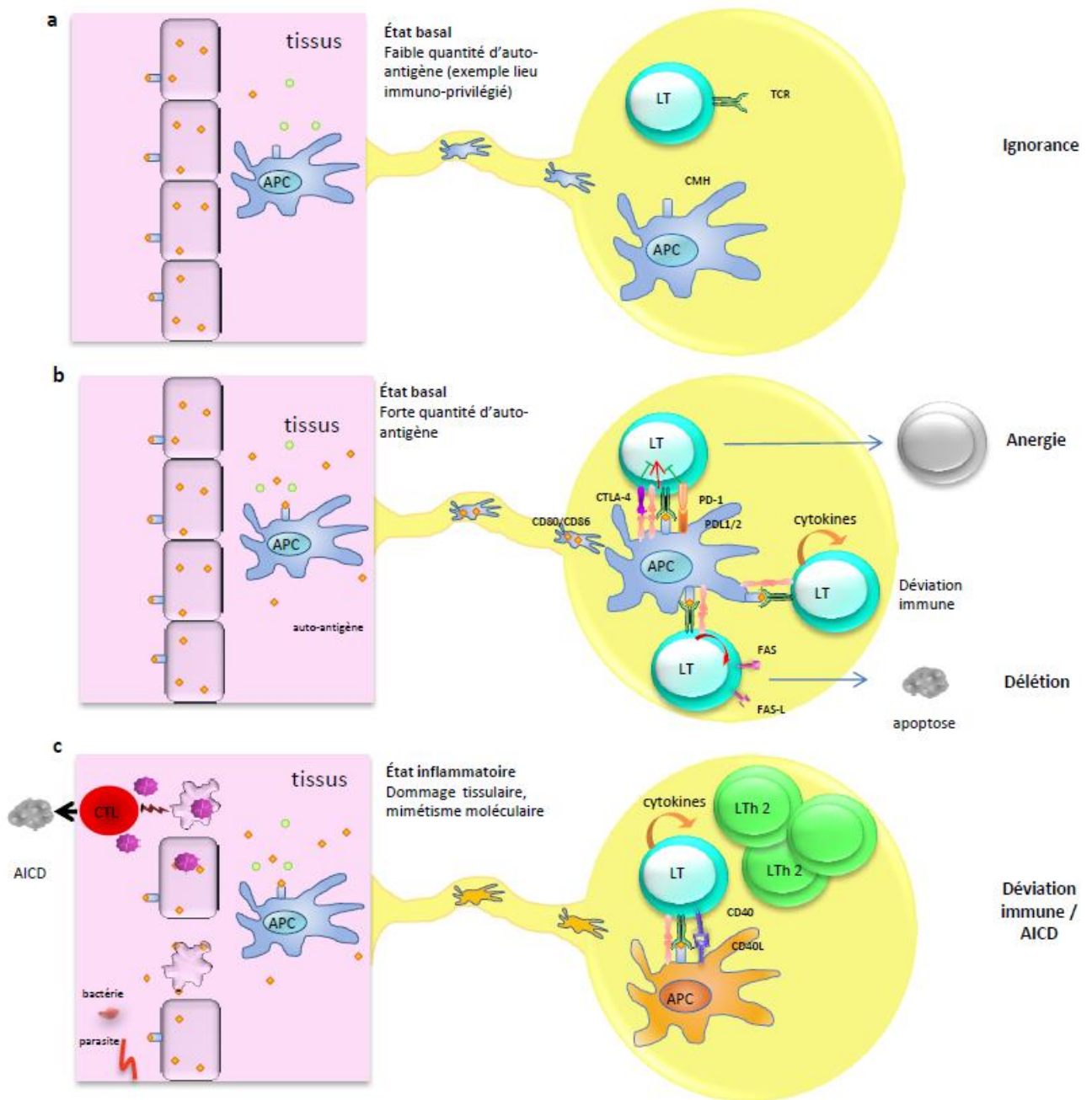


Figure 3. Schéma simplifié des divers mécanismes de tolérance passifs vers l'activation du système immunitaire. (a) Mécanisme d'ignorance où l'auto-antigène est peu ou pas présenté aux LT auto-réactifs. (b) En cas de présentation d'auto-antigènes aux LT auto-réactifs, ils peuvent devenir anergiques lorsqu'ils interagissent avec des molécules de co-stimulation inhibitrices comme PDL-1/2 ou CTLA-4. Dans le cas de l'activation des LT auto-réactifs, ils peuvent dévier vers un profil cytokinique moins inflammatoire, ou subir la délétion via les récepteurs FAS et FAS-L inducteurs d'apoptose. (c) Dans certains cas d'inflammations, induites par des pathogènes, il peut y avoir d'importants dégâts tissulaires ayant pour conséquence l'augmentation de la présentation d'auto-antigènes et l'activation des APC. Cependant s'ils sont trop activés, les LT pathogènes peuvent mourir par AICD, et une déviation immunitaire peut être observée dans le but de limiter l'inflammation.

chez les souris AIRE^{-/-} il reste de nombreuses protéines tissus spécifiques encore exprimées dans le thymus (*Derbinski et al., 2005*).

III : La tolérance périphérique.

La tolérance centrale est indispensable à l'élimination des LT auto-réactifs de forte affinité, mais reste insuffisante puisque l'on retrouve à la périphérie une quantité non négligeable de LT capables de reconnaître des auto-antigènes (*Bouneaud et al., 2000; Zehn and Bevan, 2006*). Pourtant nous ne développons pas tous des maladies auto-immunes, ceci s'explique par les mécanismes de tolérance périphérique.

A : Facteurs intrinsèques aux LT ou tolérance dite passive : ignorance, anergie et délétion.

On peut diviser la tolérance périphérique en deux parties, la partie dite " passive " qui est dépendante de l'environnement et des conditions d'activation des LT. Celle-ci se distingue par différents mécanismes comme l'ignorance, l'anergie, la délétion ou la déviation immune. (**Figure 3**)

A l'état basal, l'ignorance est le simple fait que le lymphocyte T auto-réactif ne peut s'activer, soit parce qu'il n'a pas accès à l'auto-antigène, séquestré dans le tissu même pour les " sites immuno-privilégiés ", soit parce que l'auto-antigène est en quantité insuffisante pour permettre son activation (*Kurts et al., 1999*) (**Figure 3a**). Concernant les " sites immuno-privilégiés " d'autres mécanismes de tolérance sont mis en jeu, comme par exemple la présence de leucocytes tolérogènes, l'" Anterior chamber-associated immune deviation " (ACAID), qui est un mécanisme de déviation immune propre de l'œil (*Shechter et al., 2013*). Même si la rencontre avec l'antigène est possible, elle peut conduire à une inactivation fonctionnelle des LT, appelée anergie (**Figure 3b**). Dans ce cas, les LT présentent une incapacité à proliférer et à produire de l'IL-2 lors d'une deuxième rencontre avec leur antigène. Ce phénomène fut décrit dans un premier temps *in vitro* où les LT devenaient anergiques en l'absence de molécules de co-stimulation (*Jenkins and Schwartz, 1987*). En absence de co-stimulation, le facteur de transcription nommé " Nuclear Factor of Activated T-cell " (NFAT) induit l'expression de gènes réprimant le signal TCR et la production d'IL-2 (*Bandyopadhyay et al., 2007*). *In vivo*, il a été démontré que l'engagement du récepteur " Cytotoxic T Lymphocyte Antigène 4 " (CTLA-4) ou du " Programmed Cell Death 1 " (PD1)

peut permettre l'anergie de LT auto-réactifs (*Nishimura et al., 2001; Walunas and Bluestone, 1998*). En accord avec la théorie de Polly Matzinger, il semble que des facteurs environnementaux influencent fortement l'état d'activation des LT, comme la privation en acides aminés ou en IL-2 (*Chappert and Schwartz, 2010*).

Dans le cas d'une activation complète des LT, la préservation de l'intégrité de l'organisme peut être maintenue par la déviation cytokinique (**Figure 3b**). Elle permet d'éviter les effets délétères d'une réponse immune inflammatoire, favorisant la déviation vers un type de réponse protecteur vis-à-vis d'une inflammation délétère. Le profil "lymphocyte T helper 1" (Th1) est souvent associé à une inflammation caractérisée par de fortes sécrétions d'interféron- γ (IFN- γ) et serait responsable de maladies auto-immunes comme le diabète de type I (DT1) ou l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Inversement une réponse de type lymphocyte "T helper 2" (Th2) diminuerait voire régulerait ces réponses comme par exemple le DT1 (*Bradley et al., 1999*). De plus, un environnement cytokinique comme l'IL-10, ou le TGF- β peut permettre l'induction de cellules régulatrices contrôlant la réponse immune.

Lorsque les LT sont activés, ils peuvent être tout simplement supprimés par "Activation Induced Cell Death" (AICD) (**Figure 3c**). En effet, l'interaction répétée du TCR avec le complexe p-CMH peut induire l'expression de "Apoptosis Stimulating Fragment" (FAS) et FAS-Ligand (FAS-L). La transduction du signal de la voie FAS induit la mort cellulaire via l'activation du facteur pro-apoptotique Bim (*Davey et al., 2002*) (**Figure 3c**).

B : Les mécanismes extrinsèques ou tolérance active, implications de cellules spécialisées.

Outre l'ensemble des mécanismes passifs de tolérance, les mécanismes actifs font intervenir des cellules spécialisées qui vont agir sur les LT conventionnels (Tconv).

1 : Les "Myeloid Derived Suppressive Cells" (MDSC).

Le nom de MDSC fut originellement attribué aux cellules ayant pour phénotype CD11b⁺ GR1⁺. Le fait que l'anticorps anti-GR1 fixe deux épitopes Ly6C et Ly6G, a permis la mise en évidence de plusieurs sous populations de MDSC. Chez la souris, il existe les MDSC de type monocytaire (CD11b⁺ Ly6C^{high} Ly6G⁻) et de type granulocytaire

	phénotype	naturel/ induit	fonction	Suppression
souris	CD8 ⁺	induit	protection EAE	TGF-β
	CD8 ⁺ CD75s ⁺	induit	in vivo inhibe les LT	TGF-β
	CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	induit	in vitro inhibe la prolifération des cellules T (CD86, CTLA4)	TGF-β
	CD8 ⁺ CD11c ⁺	in vivo: engagement 4-1BB (CD137)	in vitro et in vivo inhibe les T via IDO	IFN-γ / TGFβ
	CD8 ⁺ Foxp3 ⁺	induit	In vitro: Inhibition de l'activation des B et T in vivo : prévention du lupus	TGF-β
	Qa-1 restreint CD8		In vivo:prévention EAE (Qa-1, 'cytotoxicité')	
	CD8 PD1 ⁺ foxp3 ⁺	induit	lupus	TGF-β
	CD8 ⁺ CD122 ⁺	naturel	in vitro: Inhibition activation T, in vivo : prévention EAE	IL-10 /IFN-γ
	CD8 ⁺ CD28 ⁻	naturel	in vitro: Inhibition activation T , in vivo : contrôle EAE	
	CD8 ⁺ CD28 ⁻	naturel	in vitro: Inhibition activation T	IL-10
homme	CD8 ⁺ CD25 ⁺ (Foxp3 ⁺ ,GITR ⁺ ,CTLA-4 ⁺)	naturel	in vitro: Inhibition activation T	IL-10
	CD8 restreint HLA-E	naturel	diabète de type I	
	CD8 CD28 ⁻	naturel/ induit	cancer / lupus HIV	IL-10
	CD 8 CCR7 ⁺ CD45RO	induit	cancer ovarien	IL-10
	CD8 CD28 ⁻ foxp3 ⁺	naturel	cancer de la prostate	contacte cellule
	CD8 ⁺ TGFβ ⁺ CD25 ⁻	induit	HIV	TGF-β
	CD8 ⁺ CD103 ⁺ foxp3 ⁺	induit	lupus	TGF-β
	CD8 ⁺ CTLA4 ⁺ foxp3 ⁺ GITR	induit	HCV	contact cellule
	CD8 CD103	induit	isolé de sujet sain	contact cellule
	CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CTLA4 ⁺ GITR ⁺	naturel		TGF-β et CTLA4

Tableau 1. Variabilité phénotypique des LT CD8 régulateurs. Inspiré de (*Menoret et al., 2011*) .

(CD11b⁺ Ly6C^{low} Ly6G⁺), plus récemment il a aussi été rapporté que ces cellules pouvaient exprimer le récepteur à l'IL-4 (CD124), ou le récepteur au " Macrophage Colony Stimulating Factor " (M-CSF), (CD115) (*Youn et al., 2008*). Les propriétés suppressives des MDSC sont associées au métabolisme de la L arginine qui est un substrat de deux enzymes, iNOS et l'arginase I. Les produits enzymatiques d'iNOS vont conduire à la production de peroxyde d'hydrogène et de peroxyde-nitrique, deux oxydants toxiques puissants qui vont inhiber les LT environnants (*Bronte and Zanovello, 2005*). Les MDSC ont été décrites dans un premier temps comme ayant une fonction immunosuppressive dans le cancer et les maladies infectieuses (*Delano et al., 2007; Gabrilovich, 2004*). Cependant leur rôle dans les maladies auto-immunes comme l'EAE ou le diabète reste encore à définir. Des expériences montrent que les MSDC sont suppressives ex vivo (*Zhu et al., 2007*) et d'autres montrent que les CD11b⁺ Ly6C⁺ aggravent l'EAE (*King et al., 2009*).

2 : Les LT CD8 régulateurs.

Il existe une sous population de LT CD8 présentant une fonction suppressive. Le rôle des LT CD8 régulateurs fut mis en évidence de façon indirecte dans certaines maladies auto-immunes comme les myocardites ou l'EAE (*Lee et al., 2008*), dans les cancers colorectaux (*Chaput et al., 2009*) ou encore la maladie " Graft versus Host " (GvH) (*Robb et al., 2012*). L'origine exacte de ces cellules reste encore à déterminer, il semblerait qu'elles soient plutôt induites à la périphérie. Les CD8 régulateurs présentent différents phénotypes, selon les modèles et maladies dans lesquels ils ont été identifiés. Le **tableau 1** montre une liste non exhaustive de ces cellules. Certains de ces CD8 régulateurs expriment le facteur de transcription " Forkhead box protein 3 " (Foxp3). Ces LT CD8 régulateurs utilisent différents mécanismes de suppression, soit en induisant une lyse directe des cellules par la voie perforine granzyme (*Lu et al., 2008*), soit en produisant des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 (*Endharti et al., 2005*). D'autre part, une étude récente a montré l'existence de LT CD8 mémoire autorégulateurs chez la souris " Non Obese Diabetic " (NOD). En injectant un peptide spécifique des LT CD8 auto-réactifs couplé au CMH, ils observent une augmentation des LT CD8 auto-réactifs de faible affinité. Ces LT CD8 permettent la prévention du DT1 (*Tsai et al., 2010*). D'autre part chez l'homme, les LT CD8 régulateur

exprimant une molécule de CMH I like, le HLA-E et spécifique du peptide nommé Hsp60s participerait dans la régulation du DT1 (*Jiang et al., 2010*).

3 : Le rôle des lymphocytes B régulateurs.

Les cellules B régulatrices ont été mises en évidence dans diverses maladies inflammatoires comme l'hyper-sensibilité de contact, l'EAE, la colite, ou le lupus (*Mauri and Bosma, 2012*). Ces cellules sont souvent caractérisées par l'expression de CD1d et CD5 mais aussi CD19 (*Yanaba et al., 2008*). Ainsi, la déplétion des lymphocytes B (LB) CD1d^{high}CD5⁺ par un anticorps anti-CD20 avant l'induction de l'EAE exacerbe la maladie (*Matsushita et al., 2008*). On peut suggérer qu'il existe plusieurs sous-types de LB régulateurs, dont le phénotype et la localisation diffèrent (*Bouaziz et al., 2008*). D'ailleurs, les LB régulateurs sont appelés cellules " B10 " ou " Breg ". Par exemple, les Breg de phénotype CD19^{high} CD24^{high} CD38^{high} ont été identifiés chez l'homme et expriment fortement l'IL-10 (*Blair et al., 2010*). L'activation de leur " Toll Like Receptor " (TLR) (*Bosma et al., 2012*), de CD40 (*Evans et al., 2007*), et de leur BCR (*Sato et al., 1996*) induit la sécrétion d'IL-10. De plus, récemment il a été montré que l'IL-21 sécrétée par les LT active les Breg (*Yoshizaki et al., 2012*). De leur activation, il en résulte une forte production d'IL-10 qui permet l'inhibition des lymphocytes Th1 et l'induction de Treg (*Carter et al., 2011*).

4 : Les " Natural Killer T cells " (NKT).

Les NKT ont été caractérisées dans les années 1990, comme une sous-population de LT qui possède des caractéristiques communes avec les " Natural Killer " (NK) (*Makino et al., 1995*). Les NKT sont des LT innés, issus du thymus, elles représentent moins de 1% des LT (*Beaudoin et al., 2002*). Il existe 3 familles de NKT : les NKT invariants (iNKT), les NKT de type II, et les NKT " like ". Les iNKT expriment un TCR- α présentant une chaîne invariante V α 14 chez la souris et V α 24 chez l'homme. Celles-ci reconnaissent un glycolipide, l' α -galactosylcéramide (α -GalCer) présenté par une molécule de CMH " like ", CD1d. Les CMH « like » sont des molécules non polymorphes présentant des antigènes non peptidiques (*Godfrey et al., 2010; Nowak and Stein-Streilein, 2007*). Les NKT participent à la prévention des maladies auto-immunes comme le DT1 (*Novak et al., 2007*). En effet les souris NOD déficientes en CD1d sont plus susceptibles au diabète (*Wang et al., 2001*). De plus, parmi les

iNKT il existe deux sous-populations, les iNKT $CD4^+$ et les iNKT ($CD4^- CD8^- IL-17^+$) (iNKT17). Une étude a montré que les iNKT $CD4^+$ seraient protecteurs du DT1 alors que les iNKT17 accélèrent le diabète (*Simoni et al., 2011*). Cependant leur rôle est moins évident dans d'autres maladies auto-immunes comme le lupus ou l'EAE (*Balato et al., 2009*). Les NKT suppriment la réponse immune en produisant de l'IL10, en orientant la réponse immune vers une voie Th2 et en induisant des DC tolérogènes via PDL-1 et CD40 (*Hegde et al., 2010*). L'ensemble de ces cellules décrites précédemment participent au maintien de la tolérance, mais la cellule phare de la tolérance est le lymphocyte T régulateur (Treg).

Deuxième partie : Les LT régulateurs (Treg), une population clé de la tolérance.

I : Mise en évidence et phénotype.

A : Découverte et identification des Treg.

Le concept d'une population de cellules T suppressives fut établi par les expériences de Richard K. Gershon en 1971, sans pour autant pouvoir identifier clairement un marqueur de ces cellules (*Gershon and Kondo, 1971*). Plus tard, Shimon Sakaguchi, en faisant des expériences de transfert adoptif de cellules spléniques dans des souris immuno-déficientes, met en évidence une population de cellules régulatrices exprimant le CD5 (*Sakaguchi et al., 1985*). En 1990, les expériences menées par Fiona Powrie et Don Mason ont montré, chez le rat, que le transfert de cellules $CD4^+ CD45RB^{low}$ permet de prévenir un syndrome auto-immun induit par des cellules $CD4^+ CD45RB^{high}$ (*Powrie and Mason, 1990*). Toutefois, ces marqueurs sont exprimés par un grand nombre de cellules du système immunitaire et ne permettent pas d'identifier distinctement les LT suppressifs. Ce n'est qu'en 1995 que l'équipe de Shimon Sakaguchi a révélé un premier marqueur constitutif des Treg, le CD25, qui est la chaîne α du récepteur à l'IL-2. En effectuant des expériences de co-transfert, il a montré qu'une population régulatrice $CD4^+ CD25^+$ permet de prévenir l'auto-immunité, alors que les cellules $CD4^+ CD25^-$ l'induisent (*Sakaguchi et al., 1995*). Malgré le fait que les LT effecteurs activés expriment aussi le CD25, cette expression est transitoire et inductible alors qu'elle est permanente sur les Treg (*Fisson et al., 2003*).

B : Un facteur clé de la Tolérance: Foxp3.

Le gène *Foxp3*, porté par le chromosome X, code pour le facteur de transcription Foxp3 (Forkhead box protein 3) anciennement appelé Scurfin. Ce facteur de transcription est d'une importance primordiale dans la tolérance. L'absence ou un dysfonctionnement de Foxp3 chez la souris scurfy et chez les patients IPEX (Immune Dysregulation Polyendocrinopathy Enteropathy X-linked), se manifeste par un syndrome auto-immun généralisé (*Brunkow et al., 2001; Wildin et al., 2001*). En 2003, plusieurs équipes ont montré que Foxp3 est exprimé spécifiquement par les Treg ($CD4^+ CD25^+$) (*Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003*). Des souris irradiées reconstituées avec un mélange de moelle osseuse issue de souris déficientes pour Foxp3 ou de souris sauvages démontrent que l'ensemble des cellules

Famille	nom du récepteur	fonction	type de Treg	souris	homme	effet	expression après activation	références.
forkhead Box protéine	Foxp3	facteur de transcription	thymique et périphérique	x	x	suppression, homeostasie.	↗	<i>sakagushi 2003; Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003</i>
IKAROS	Helios	facteur de transcription membre de la famille IKAROS	supposé thymique	x	x			<i>thorton et al 2010</i>
IRF	IRF-4	Régule l'expression de ICOS, blimp 1, CD62L ...	thymique et périphérique	x	nd	activation, migration.	↗	<i>Cremey et al., 2011</i>
récepteur γ C	CD127	chaîne α du récepteur à l'IL-7 faiblement exprimé les Treg	thymique et périphérique		x			<i>liu et al 2006</i>
récepteur γ C	CD25	chaîne α du récepteur à l'IL-2	thymique et périphérique	x	x	survie, prolifération	↗	<i>Fontenot et al., 2003; Hori et al., 2003</i>
CD28	CTLA-4	costimulation inhibitrice	thymique et périphérique	x	x	homéostasie et suppression		<i>Takahashi et al., 2000</i>
CD28	ICOS	costimulation	thymique et périphérique/ Treg	x	x	activation prolifération	↗	<i>Burmeister et al., 2008</i>
récepteur au TNF	GITR	costimulation	thymique et périphérique	x	x	suppression	↗	<i>Shimizu et al., 2002</i>
récepteur au TNF	4-1BB	costimulation	thymique et périphérique	x	x	prolifération en condition inflammatoire		<i>Sugimoto et al., 2006; Irie et al., 2007</i>
récepteur au TNF	OX40	costimulation	thymique et périphérique	x	x	survie et fonction suppressive	↗	<i>Fontenot et al., 2005; Griseri et al., 2010</i>
récepteur au TNF	TNFR-2	costimulation	thymique et périphérique	x	x	prolifération	↗	<i>Chen et al., 2007</i>
Intégrine	CD103	intégrine	thymique et périphérique Treg activés	x	x	migration	↗	<i>Suffia et al., 2005</i>
	NRP-1	récepteur des semaphorines et du VEGF	supposé thymique	x	x	activation	↗	<i>Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012</i>
	GARP	inconnu	Treg activés		x	unutzman		<i>Wang et al., 2008</i>

Tableau 2. Liste non exhaustive des différents marqueurs des Treg.

Foxp3^{-/-} sont dépourvues de Treg (*Fontenot et al., 2003*). De même, un transfert adoptif de Treg (CD4⁺ CD25⁺) issus de souris sauvages à des souris Foxp3^{-/-} permet une guérison de leur pathologie auto-immune. D'autre part, les expériences menées par l'équipe de R Flavell montrent que la diminution du niveau d'expression de Foxp3 affecte directement la capacité suppressive des Treg (*Wan and Flavell, 2007*). En accord avec ces données, l'absence d'expression de Foxp3 dans les Treg matures montre non seulement une capacité suppressive réduite mais aussi une acquisition de propriétés propres aux Tconv comme la production d'IL-2, d'IL-17 ou d'IFN- γ (*Williams and Rudensky, 2007*). L'ensemble de ces études indique que Foxp3 est un marqueur essentiel au développement et à la fonction suppressive des Treg. Est-il le seul ?

Trois groupes différents ont effectué des études transcriptomiques dans le but d'établir la signature moléculaire des Treg. Ils ont isolé les Treg soit sur la base de l'expression de la GFP associée à celle de Foxp3, soit sur l'expression de CD4 et CD25 issues de souris déficientes ou non pour Foxp3. Ils ont ensuite comparé ces transcriptomes entre eux et avec ceux des Tconv (*Gavin et al., 2007; Hill et al., 2007; Sugimoto et al., 2006*). Ces études montrent que la signature moléculaire des Treg est pour moins de la moitié dépendante de Foxp3, et que d'autres facteurs sont mis en jeu.

En conclusion, Foxp3 a un rôle essentiel dans l'homéostasie, le phénotype et la fonction suppressive des Treg, mais il n'est pas l'unique marqueur des Treg.

C : Autres marqueurs associés aux Treg.

Comme énoncé précédemment, les principaux marqueurs des Treg sont CD4 CD25 Foxp3, mais il existe d'autres marqueurs associés au phénotype régulateur (**Tableau 2**). On distingue: (i) des molécules de co-stimulation de la famille CD28 comme le CTLA-4 (*Takahashi et al., 2000*) ou le "Inducible Co-Stimulator" (ICOS), (ii) des membres de la famille du récepteur du "Tumor Necrosis Factor" (TNF) tels que le "Glucocorticoid Induced TNF Receptor" (GITR) (*Shimizu et al., 2002*), ou OX40 (iii) un facteur de transcription de la famille IKAROS, Hélios (iv) un membre de la famille des intégrines, CD103. En effet CD103 est la chaîne α de l'intégrine $\alpha\beta 7$, elle peut être exprimée sur les Treg activés. L'expression de CD103 sur les Treg leur permettrait d'avoir une meilleure capacité migratoire vers les tissus (*Suffia et al., 2005*). Il existe aussi d'autres marqueurs comme "lymphocyte activation gene 3" (LAG-3) qui sera abordé ultérieurement. Ces récepteurs participent à l'homéostasie et à

la fonction suppressive des Treg. Malgré leur expression constitutive sur une fraction des Treg à l'état basal, ils peuvent aussi être présents sur les LTconv activés. Par conséquent, eux seuls ne permettent pas de définir la population de Treg.

Un autre marqueur, la neuropiline-1 (NRP-1), est exprimé par les Treg. L'expression de la NRP-1 et d'Hélios permettrait de distinguer les Treg d'origine thymique des Treg induits. Il semble que les Treg d'origine thymique expriment fortement la NRP-1 (*Weiss et al., 2012; Yadav et al., 2012*) et Hélios (*Thornton et al., 2010*). Cependant, dans des conditions inflammatoires, la distinction entre Treg thymiques et induits reste difficile puisque des Treg induits activés pourraient aussi exprimer la NRP-1 ou Hélios (*Gottschalk et al., 2012*).

D : Et chez l'homme ?

Chez l'homme, une population de Treg a également été identifiée. Les Treg humains expriment le CD25, Foxp3, CD45RO, CTLA-4 et CD122 (chaîne β du récepteur à l'IL-2), et sont capables de supprimer les LT CD4⁺ CD25⁻ *in vitro*. Comme chez la souris, les Treg humains ne produisent pas d'IL-2 et sont anergiques si on les stimule via leur TCR sans ajout d'IL-2 (*Jonuleit et al., 2001; Stephens et al., 2001*). Cependant, chez l'homme le CD25 n'est pas un aussi bon marqueur de Treg comme il peut l'être chez la souris. L'homme étant en contact permanent avec des agents pathogènes, leur Tconv sont activés de façon constante et expriment aussi le CD25 (*Baecher-Allan et al., 2001*). Le facteur de transcription Foxp3 est aussi présent dans les Treg humains mais son expression reste insuffisante pour distinguer cette population, car les Tconv expriment aussi Foxp3 après activation (*Allan et al., 2007*). Ces dernières années de nouveaux marqueurs comme le CD127 (chaîne α du récepteur à l'IL-7) permettent de distinguer plus facilement les Treg humains. Les Treg n'expriment pas ou peu le CD127 contrairement aux Tconv (*Liu et al., 2006*). De plus, d'autres travaux ont montré que l'expression de CD45RA sur les Treg (CD25⁺, Foxp3⁺) permet de distinguer les Treg naïfs (CD25⁺ CD45RA⁺, Foxp3^{low}) des Treg activés (CD25^{high}, CD45RA⁻, Foxp3^{high}) (*Miyara et al., 2009*). La protéine transmembranaire, « Glycoprotein A Repetitions Predominant » (GARP) est aussi un autre marqueur de Treg humains. GARP est exprimée spécifiquement sur les LT CD4⁺ Foxp3⁺ activés et son expression est associée à leur capacité suppressive (*Wang et al., 2008b*).

II : Origines des Treg.

A : Origine et différenciation thymique des Treg chez la souris.

1 : Mise en évidence de l'origine thymique des Treg.

L'origine et la différenciation des Treg dit "naturels" ou "thymiques" se fait comme son nom l'indique dans le thymus. Cette origine a d'abord été mise en évidence en effectuant des expériences d'ablation de thymus à des nouveau-nés. En effet, des souriceaux thymectomisés 3 jours après leur naissance développent des pathologies auto-immunes alors que ceux thymectomisés à 7 jours ne sont, eux, pas malades. Cette auto-immunité est due à un nombre trop faible de Treg qui n'arrivent pas à contrôler la forte expansion des Tconv dans l'environnement lymphopénique des jeunes souriceaux (*Asano et al., 1996; Bonomo et al., 1995*).

2 : Le lieu de différenciation.

Si les Treg sont d'origine thymique et qu'ils se forment après la naissance, quel est alors le lieu de différenciation exact des Treg ? Cette question reste en suspens et attise encore aujourd'hui des débats. La création des souris *Knock' in* Foxp3 GFP a permis d'identifier la médulla comme zone thymique de la différenciation des Treg (*Fontenot et al., 2005a*). Ces travaux sont en accord avec le rôle tolérogène de l'expression de AIRE sur les mTEC (*Anderson et al., 2002*). Par ailleurs, les souris n'exprimant pas de molécules du CMH-II sur les mTEC présentent un déficit en Treg (*Hinterberger et al., 2010*). Même si le lieu de prédilection de la différenciation thymique des Treg semble être la médulla, ils peuvent aussi se différencier dans le cortex thymique. Des travaux précurseurs ont démontré que les cTEC sont aussi responsables de la différenciation des Treg (*Bensinger et al., 2001*). L'expression du CMH-II restreinte aux cTEC est suffisante pour la différenciation des Treg même si en périphérie la proportion de Treg est diminuée en comparaison avec les souris normales (*Liston et al., 2008b*). A l'heure actuelle, le lieu exact de la différenciation des Treg thymiques reste encore à définir.

B : Les signaux nécessaires à la génération des Treg dans le thymus.

1 : Le rôle du TCR.

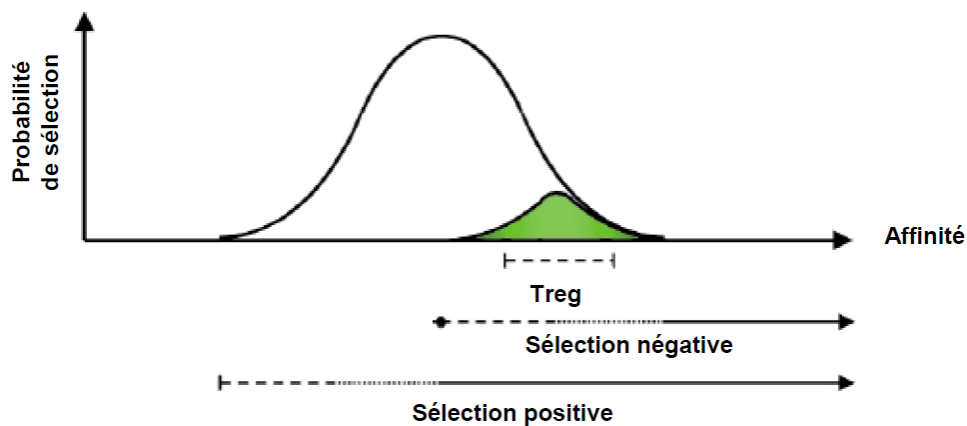


Figure 4. Modèle représentant la probabilité de sélection des Treg thymiques basée sur l'affinité. Lors de la sélection positive, seuls les précurseurs ne reconnaissant pas le CMH sont éliminés. Pendant la sélection négative les thymocytes ayant une trop forte affinité pour le p-CMH sont éliminés et seuls les thymocytes présentant une affinité intermédiaire deviennent des Treg. Adapté de (*Maloy and Powrie, 2001*)

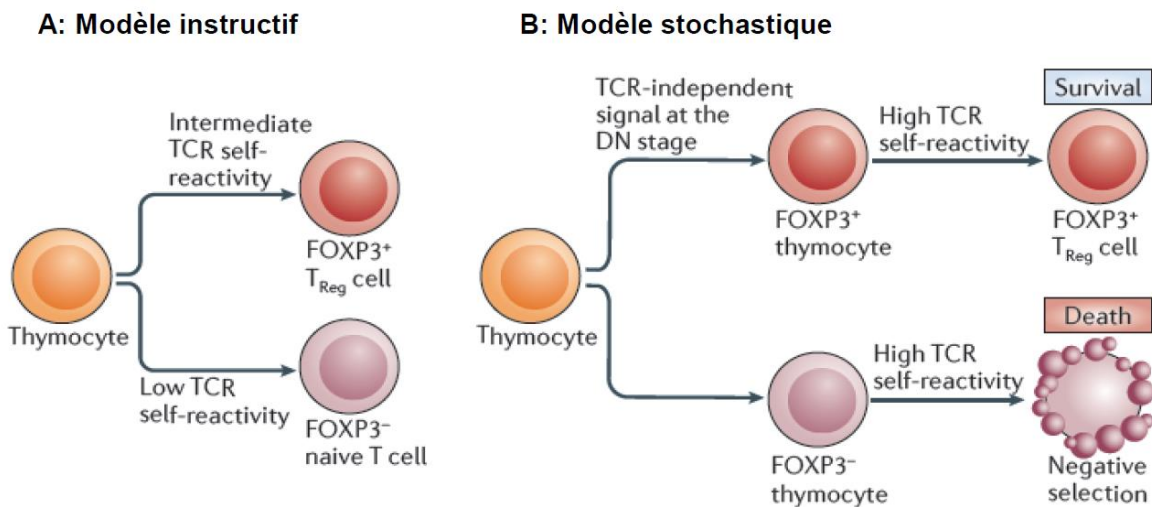


Figure 5. Modèles proposés de la différenciation thymique des Treg. (A) modèle instructif, la différenciation des Treg est basée sur la capacité du signal du TCR à induire l'expression de Foxp3. Les thymocytes recevant un signal du TCR trop fort sont éliminés par la sélection négative (non montré). Les TCR recevant un signal intermédiaire vont exprimer Foxp3. Si le signal TCR est de faible intensité, les thymocytes deviendront des Tconv. (B) modèle stochastique. L'induction de Foxp3 est attribuée à un signal indépendant de celui délivré par le TCR, probablement au stade double négatif ($CD4^-$, $CD8^-$). Les thymocytes $Foxp3^+$ présentant une auto-réactivité intermédiaire ne sont pas éliminés par la sélection négative, à l'inverse des thymocytes $Foxp3^-$. Issu de (*Hsieh et al., 2012*).

L'engagement du TCR est essentiel au développement des Treg thymiques. En 1999, l'équipe de S Sakagushi observe une absence totale de Treg dans des souris transgéniques pour un TCR spécifique de l'ovalbumine (OVA) de poulet croisées en fond RAG^{-/-} (Itoh *et al.*, 1999). Chez ces souris les LT ou leurs précurseurs n'expriment qu'un seul TCR, spécifique d'un antigène étranger. Ainsi, en absence d'antigène cognitif du soi, les Treg ne peuvent se différencier dans le thymus. Cette expérience fut la première à mettre en avant le rôle essentiel d'un signal TCR dans la différenciation thymique des Treg. L'affinité ou l'avidité des thymocytes pour les antigènes du soi sont déterminantes dans la différenciation en Treg. Cela a été démontré à l'aide de modèles transgéniques dont les LT expriment un TCR spécifique de l'hémagglutinine (HA) ou de l'OVA. Lorsque ces souris sont croisées avec des souris exprimant HA ou OVA dans le thymus, la différenciation en Treg est favorisée (Apostolou *et al.*, 2002; Jordan *et al.*, 2001). De plus, un précurseur reconnaissant un antigène pour lequel il est faiblement spécifique ne se différencie pas en Treg. On estime que l'affinité nécessaire à un LT pour devenir un Treg est supérieure à celle requise pour la sélection positive dans les Tconv, et probablement inférieure à celle induisant une sélection négative (**Figure 4**). Il existe deux modèles principaux expliquant la différenciation des Treg thymiques. Le modèle stochastique et le modèle instructif (**Figure 5**).

Dans le modèle stochastique l'induction de Foxp3 est attribuée à un signal indépendant de celui délivré par le TCR. Ainsi les thymocytes Foxp3⁺ présentant une auto-réactivité intermédiaire ne sont pas éliminés par la sélection négative, à l'inverse des thymocytes Foxp3⁻. Les expériences supportant ce modèle montrent que les thymocytes spécifiques pour un TCR, en présence de leur antigène cognitif, subissent la sélection négative au lieu de se différencier en Treg (Shih *et al.*, 2004). De plus, dans un autre modèle de souris transgéniques pour un TCR présentant l'antigène cognitif de façon inductible, le nombre absolu de Treg ne change pas, seule leur proportion parmi les CD4⁺ est modifiée (van Santen *et al.*, 2004). D'ailleurs la comparaison du TCR entre les Tconv et les Treg montre un chevauchement supportant ce modèle (Pacholczyk *et al.*, 2007). Cependant ces données sont en contradiction avec les travaux de l'équipe de A Rudensky, qui observe une différence de répertoire entre les Tconv et les Treg où les Treg seraient plus spécifiques aux antigènes du soi (Hsieh *et al.*, 2004). Ces travaux sont en accord avec le modèle instructif. Dans ce modèle la différenciation des Treg est basée sur la capacité du signal TCR à induire l'expression de

Foxp3. Ainsi les thymocytes recevant un signal TCR trop fort sont éliminés par la sélection négative. Les TCR recevant un signal intermédiaire vont exprimer Foxp3. Si le signal est de faible intensité, les thymocytes deviendront des Tconv.

D'autre part, deux études ont mis à jour un mécanisme fondamental de la différenciation thymique des Treg: l'existence d'une "niche" thymique réservée à leur développement. En effet des travaux utilisant des souris transgéniques exprimant un TCR spécifique des Treg ont montré que le développement des Treg a lieu uniquement lorsque les précurseurs spécifiques pour ce TCR sont présents en faible quantité (inférieure à 1% du nombre total des précurseurs) (*Bautista et al., 2009; Leung et al., 2009*). Cette étude suggère que le développement des Treg spécifiques d'un antigène donné est limité. Une autre étude récente a montré l'existence d'une compétition intra-clonale au sein même de la niche des Treg. Pour cela les auteurs ont créé un modèle de souris Nur77-GFP exprimant la "Green Fluorescent Protein" (GFP) sous le promoteur de Nur77, qui est activé uniquement en réponse au signal TCR. Dans les populations polyclonales, ils ont observé que l'expression de la GFP est augmentée dans les Treg en comparaison avec les Tconv. De plus, seuls les précurseurs des Treg spécifiques d'un antigène donné exprimant un signal fort de leur TCR se développent (*Moran et al., 2011*).

2 : La transduction du signal TCR/CMH.

Au-delà des différents modèles décrits plus haut, il semble évident que l'interaction du TCR et la signalisation en aval soient primordiales pour la différenciation des Treg. Cette signalisation est complexe et met en œuvre plusieurs acteurs (**Figure 6**). Suite à l'interaction entre le p-CMH et le TCR, le signal est déclenché par le CD3 qui recrute et phosphoryle Zap-70, qui lui-même phosphoryle le "Linker Activated T cells" (LAT). LAT activé se fixe sur la phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) (*Zhang et al., 1998*). De façon intéressante il a été observé qu'une mutation de LAT empêchant sa fixation sur la PLC γ 1 engendre une absence totale de Foxp3 dans le thymus et en périphérie (*Koonpaew et al., 2006*). La PLC γ 1 active directement ou indirectement plusieurs voies de signalisations comme NF- κ B, NF-AT ou AP-1 qui se fixe directement au promoteur de *Foxp3* ou active d'autres intermédiaires. En effet, le gène Foxp3 présente quatre régions régulatrices de son expression : le promoteur et 3 régions non codantes nommées "Conserved Non-coding Dna Sequences" (CNS) (**Figure 6**).

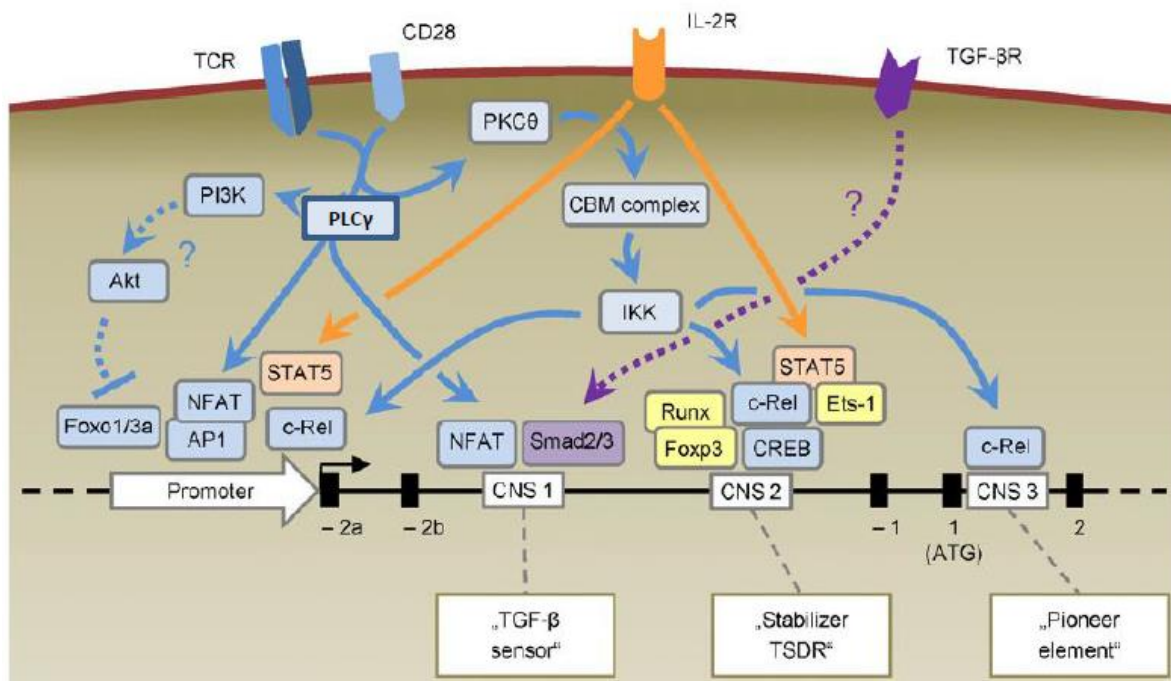


Figure 6. Les Facteurs impliqués dans la régulation de l'expression du gène Foxp3 dans le thymus. L'induction des Treg se fait par l'intermédiaire de l'activation de plusieurs voies de signalisation possibles. La première étape de l'induction de l'expression de Foxp3 se fait via le signal TCR/CD28 qui va induire l'activation PLC γ 1. Celle-ci va induire par différentes voies conduisant à plusieurs facteurs induisant l'expression du gène Foxp3 tels que le NFAT, AP1 et c-Rel (flèche bleue pleine). De plus, il se pourrait que l'activation de la voie PI3K/Akt puisse induire la séquestration des FOXO 1/3 qui sont des activateurs du promoteur du gène Foxp3 (flèche bleue pointillée). La deuxième étape consiste en la stabilisation de l'induction de l'expression de Foxp3. Ainsi l'IL-2, en induisant STAT5, peut consolider les complexes initiateurs du gène (flèche orange). Enfin le TGF- β pourrait stabiliser l'expression de Foxp3 via smad2/3 (flèche violette pointillée). Adapté de (Klein and Jovanovic, 2011).

2a : La voie NF- κ B et c-Rel.

Suite à l'activation du TCR, la protéine K C θ (PKC θ) active le complexe CARMA1, BCL-10, MALT1 (CBM) qui va permettre l'activation de la voie canonique de NF- κ B. Celle-ci entraîne une translocation de c-Rel au noyau qui se fixe lui-même au promoteur de Foxp3 et sur les régions CNS3 et CNS2 (*Long et al., 2009*). Les souris déficientes pour c-Rel ou CARMA1 présentent une forte diminution des Treg dans le thymus. Dans ces souris même une expression activant le “ Transducers and Activators of Transcription ” 5 (STAT5) ou “ B-cell leukemia protein-2 ” (Bcl-2) ne permet pas de recouvrer le défaut de Treg (*Molinero et al., 2009*).

2b : La voie PI3-Akt.

L'engagement du TCR associé aux molécules de co-stimulation CD28 et de l'IL-2, active fortement la voie phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K) dans les Tconv. Une telle activation dans les thymocytes bloque la différenciation des Treg. Par exemple une surexpression d'AKT dans les thymocytes va empêcher la différenciation des Treg. (*Haxhinasto et al., 2008*). De plus une activation de la voie PI3K inhibe l'expression des facteurs de transcription “ Forkhead box protein O ” 1 et 3 (FOXO 1 et FOXO 3). Ces derniers étant des facteurs de transcription favorisant l'expression de Foxp3 par fixation à son promoteur (*Ouyang et al., 2010b*). Enfin une délétion de FOXO 1 et/ou 3 conduit à une auto-immunité, associée à un défaut du développement et de la fonction des Treg. (*Kerdiles et al., 2010; Ouyang et al., 2009; Ouyang et al., 2012*).

2c: La voie NF-AT et AP-1.

Le signal TCR active aussi la voie NF-AT et AP-1, qui va favoriser aussi l'expression de Foxp3 par fixation sur son promoteur. Une inhibition de la voie NF-AT par la cyclosporine A induit une diminution du développement des Treg (*Mantel et al., 2006*).

3 : Le rôle des cytokines dans le développement des Treg.*3a: Le rôle de l'IL-2, IL-15, et STAT5.*

L'IL-2, cytokine de la famille γ C, est essentielle pour l'homéostasie des Treg en périphérie mais aussi pour la différenciation thymique de ces cellules. En effet les souris déficientes en IL-2 ou en IL-2R α (CD25) possèdent deux fois moins de Treg dans le thymus et une expression diminuée de Foxp3 en comparaison avec une souris WT (*Fontenot et al., 2005b*). Cette diminution incomplète peut s'expliquer par le fait que l'IL-2 et l'IL-15 présentent un rôle redondant en se fixant au même dimère CD122-CD132 (chaînes β et γ du récepteur de l'IL-2). Ainsi les souris à la fois IL-2 $^{-/-}$ IL-15 $^{-/-}$ ou pour CD122 ont une absence presque totale de Treg dans le thymus (*Burchill et al., 2007; Vang et al., 2008*). D'un point de vue moléculaire, l'activation de CD122-CD132 induit la phosphorylation de STAT5 qui une fois activé se fixe sur le promoteur de Foxp3 et CNS2 du gène Foxp3 (*Zheng et al., 2010*). Les souris STAT5b $^{-/-}$ présentent un déficit total en Treg à la périphérie (*Yao et al., 2007*), alors qu'une expression forcée de STAT5 dans les souris CD122 $^{-/-}$ restaure l'expression de Foxp3. L'ensemble de ces travaux montre que l'IL-2, l'IL-15 via le CD122 et STAT5 sont indispensables à l'expression de Foxp3 dans les Treg.

Les travaux de CW Lio et CW Hsieh ont montré que des thymocytes CD4 SP CD25^{hi}GITR^{hi}Foxp3⁻ ont la capacité de se différencier spontanément en Treg *in vitro* en présence d'IL-2 ou d'IL-15 (*Lio and Hsieh, 2008*). Les auteurs proposent alors un modèle de différenciation des Treg en deux étapes où le signal TCR permet l'expression de CD25, puis dans un deuxième temps le signal IL-2 induit l'expression de Foxp3. D'autre part, une étude récente suggère que suite au signal TCR, les Treg expriment plus fortement le CD122, les rendant plus sensibles à l'IL-2. Ainsi les précurseurs Foxp3⁻ CD25⁺ CD122⁺ se dirigeraient spontanément vers la lignée des Treg (*Goldstein et al., 2011*).

3b : Le TGF- β .

Le rôle du TGF- β dans la différenciation des Treg est controversé. De façon similaire aux souris Foxp3 $^{-/-}$ et IL-2 $^{-/-}$, les souris TGF- β 1 $^{-/-}$ meurent d'auto-immunité sévère (*Shull et al., 1992*). Cette maladie est attribuée à un déficit partiel en Treg à la périphérie (*Marie et al., 2005*). Toutefois 8 à 10 jours après leur naissance, les souris TGF- β 1 $^{-/-}$ ou TGF- β RII $^{-/-}$ acquièrent une proportion normale de Treg dans le thymus (*Li et al., 2006*) et l'ajout d'un anticorps bloquant le TGF- β n'affecte pas la différenciation des précurseurs CD4⁺ Foxp3⁻ en CD4⁺ Foxp3⁺. Ces données suggèrent que le TGF- β n'influencerait pas la différenciation

thymique des Treg et que la maladie des souris TGF- β 1^{-/-} serait probablement causée par une diminution de la capacité suppressive des Treg. Cependant, les souris mutantes pour le récepteur I au TGF- β (TGF- β RI) exprimé spécifiquement dans les LT, présentent une réduction des Treg 3-5 jours après leur naissance. Cette diminution est rapidement compensée au bout d'une semaine (*Liu et al., 2008*). De plus, une délétion spécifique du récepteur II au TGF- β (TGF- β RII) dans les LT affecte la différenciation des Treg en augmentant l'expression de facteurs pro-apoptotiques comme Bim et Bax (*Ouyang et al., 2010a*). D'un point de vue moléculaire, *in vitro*, il a été décrit que le TGF- β via smad2/3 favorise l'expression de Foxp3 au niveau du CNS1 du gène Foxp3 (*Tone et al., 2008*). Récemment l'équipe de Von Bohemer, en utilisant des souris mutantes pour le site de fixation de smad 2/3 sur le CNS1 dans les Treg (foxp3^{CNS1/smad^{mut}}), n'a pas observé de défaut de développement des Treg thymiques (*Schlenner et al., 2012*). Ces travaux remettent aussi en cause le rôle du TGF- β dans la différenciation des Treg.

Il semble donc que la voie du TGF- β ne soit pas essentielle au développement des Treg thymiques mais qu'elle pourrait favoriser la survie de ces cellules.

4 : Les molécules de co-stimulation.

La co-stimulation a un rôle important dans la différenciation des Treg thymiques. Les souris déficientes en CD28 ou leurs ligands, CD80 et CD86, ont une très forte diminution de la proportion des Treg (*Lohr et al., 2004; Salomon et al., 2000*). Les molécules de co-stimulation agissent à différents niveaux dans la différenciation des Treg. Une des hypothèses était qu'une déficience en CD28 conduit à une diminution de l'IL-2 empêchant la différenciation des Treg (*Burchill et al., 2008*). Celle-ci a été écartée car les souris chimères obtenues par greffe de moelle osseuse issue de souris CD28^{-/-} et WT chez un hôte, les précurseurs issus des souris CD28^{-/-} n'ont pas la capacité de se différencier en Treg (*Tai et al., 2005*). Ces résultats montrent qu'il y a un effet intrinsèque de la signalisation par CD28 dans la différenciation des Treg. D'ailleurs il semble que les molécules de co-stimulation CD28 induisent la voie LcK qui stabiliserait Foxp3 (*Semple et al., 2011*).

5 : Les autres facteurs régulateurs de Foxp3.

J'ai abordé, de façon non exhaustive, les principales voies d'activation impliquées dans la différenciation des Treg. Cependant, l'implication de plusieurs autres facteurs s'est

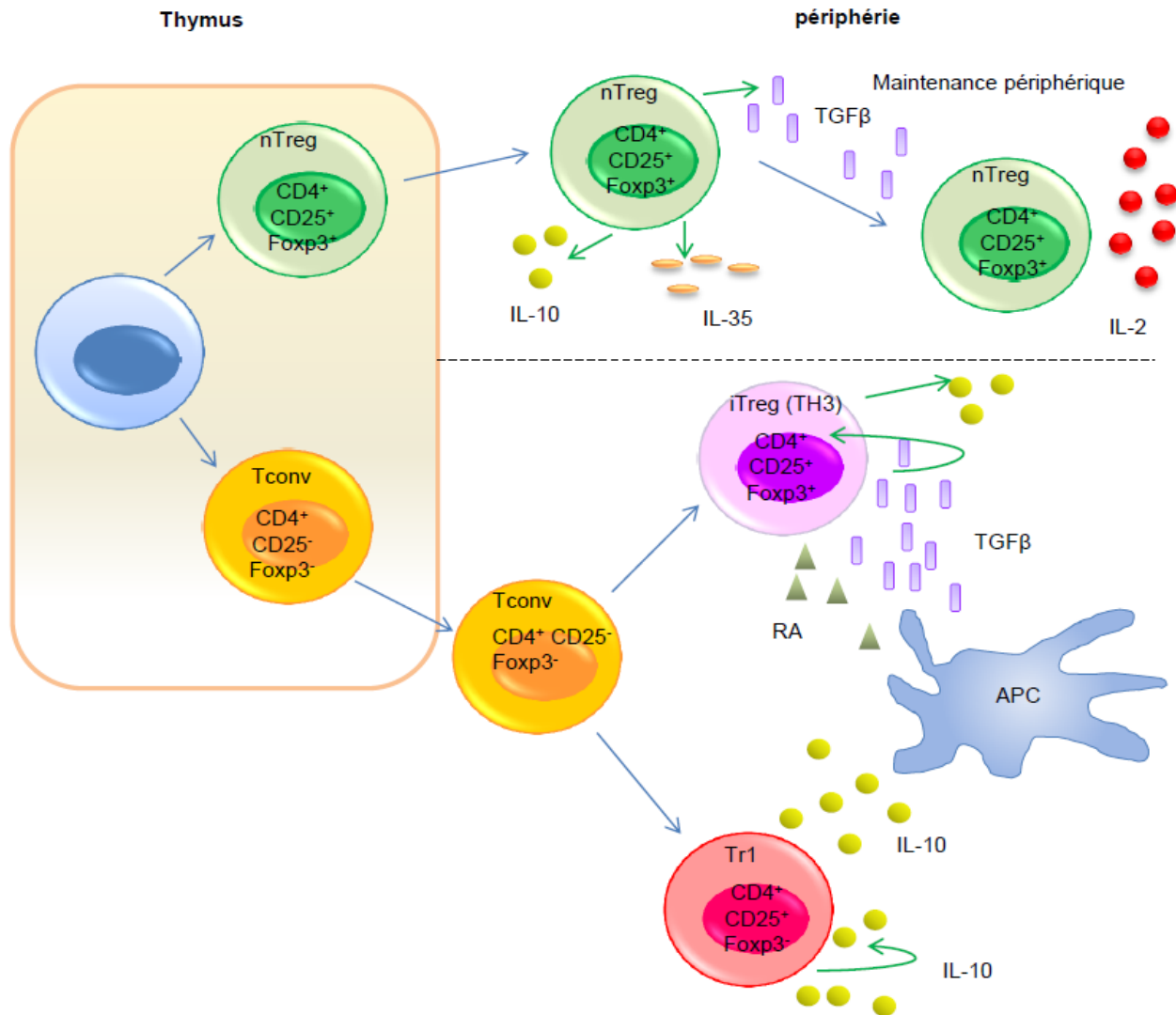


Figure 7. Schéma simplifié des facteurs participant à l'induction des différents Treg en comparaison avec les Treg d'origine thymique. Les Treg d'origine thymique sont directement issus des précurseurs dans le thymus. Ces Treg vont synthétiser à la périphérie différentes cytokines immuno-régulatrices telles que le TGF-B, l'IL-10 et l'IL-35. La survie de ces Treg dépend de l'IL-2 environnante. Les Treg induits sont eux issus de Tconv différenciés à la périphérie par l'IL-10/ TGF-β. On distingue deux types de Treg induits : les Tr1 (Foxp3⁻) producteurs d'IL-10 et les iTreg ou TH3 (Foxp3⁺). RA= « retinoic acid »

révélee importante dans l'induction de Foxp3. Le facteur de transcription Ets-1 semble jouer un rôle dans l'expression de Foxp3 en déméthylant les régions CNS du gène Foxp3. En effet les souris déficientes pour cette protéine ont un nombre de Treg réduit (*Mouly et al., 2010*). D'un point de vue épigénétique, la méthylation ou l'acétylation des histones proches du gène Foxp3 et la déméthylation des îlots CpG présents sur le gène Foxp3 vont permettre ou réprimer l'accessibilité du gène à certains facteurs de transcription (*Lal and Bromberg, 2009*). Par exemple le CNS2, connu aussi sous le nom de "Treg-specific Demethylated Regions" (TDSR), est spécifiquement déméthylé dans les Treg matures. La méthylation ou la déméthylation du CNS3 joue aussi un rôle critique dans la différenciation des Treg dans le thymus (*Zheng et al., 2010*).

C : Les Treg induits en périphérie.

En complément des Treg d'origine thymique, les Tconv peuvent devenir eux aussi régulateurs à la périphérie. On distingue différents types cellulaires de Treg induits à la périphérie : les Tr1 Foxp3⁻ (Tr1) et les Treg induits Foxp3⁺ (**Figure 7**).

1 : Les Treg induits par l'IL-10 (Tr1).

L'équipe de MG Roncarolo a mis en évidence l'existence de cellules produisant fortement de l'IL-10 issues de patients SCID transplantés avec des cellules souches hématopoïétiques (*Bacchetta et al., 1994*). Ces cellules nommées Tr1 sont induites *in vitro* à partir de LT naïfs stimulés par leur antigène cognitif en présence d'IL-10. Les Tr1 générés produisent fortement de l'IL-10 et du TGF- β mais pas d'IL-2 ni d'IL-4, ce qui permet de les différencier des Tconv Th1 ou Th2. Chez l'homme, les Tr1 participent à la tolérance. En effet des Tr1 isolés de donneurs sains présentent une capacité suppressive dirigée contre des lymphocytes auto-réactifs (*Kitani et al., 2000*). Comme ces cellules n'expriment pas Foxp3, il est difficile de les mettre en évidence chez la souris non manipulée. Toutefois, une étude a montré que les Tr1 ont un rôle régulateur puisqu'ils suppriment la prolifération de Tconv *in vitro* et *in vivo* dans un modèle de colite (*Groux et al., 1997*). D'autre part des études récentes montrent que l'IL-27, membre de la famille des cytokines de l'IL-12, peut participer à l'induction et à la prolifération des Tr1 (*Awasthi et al., 2007*). Enfin, plusieurs travaux montrent que l'injection d'IL-10 combinée à la rapamycine induit des Tr1, limitant ainsi le rejet allogénique dans un modèle de greffe d'îlots pancréatiques (*Battaglia et al., 2006a*).

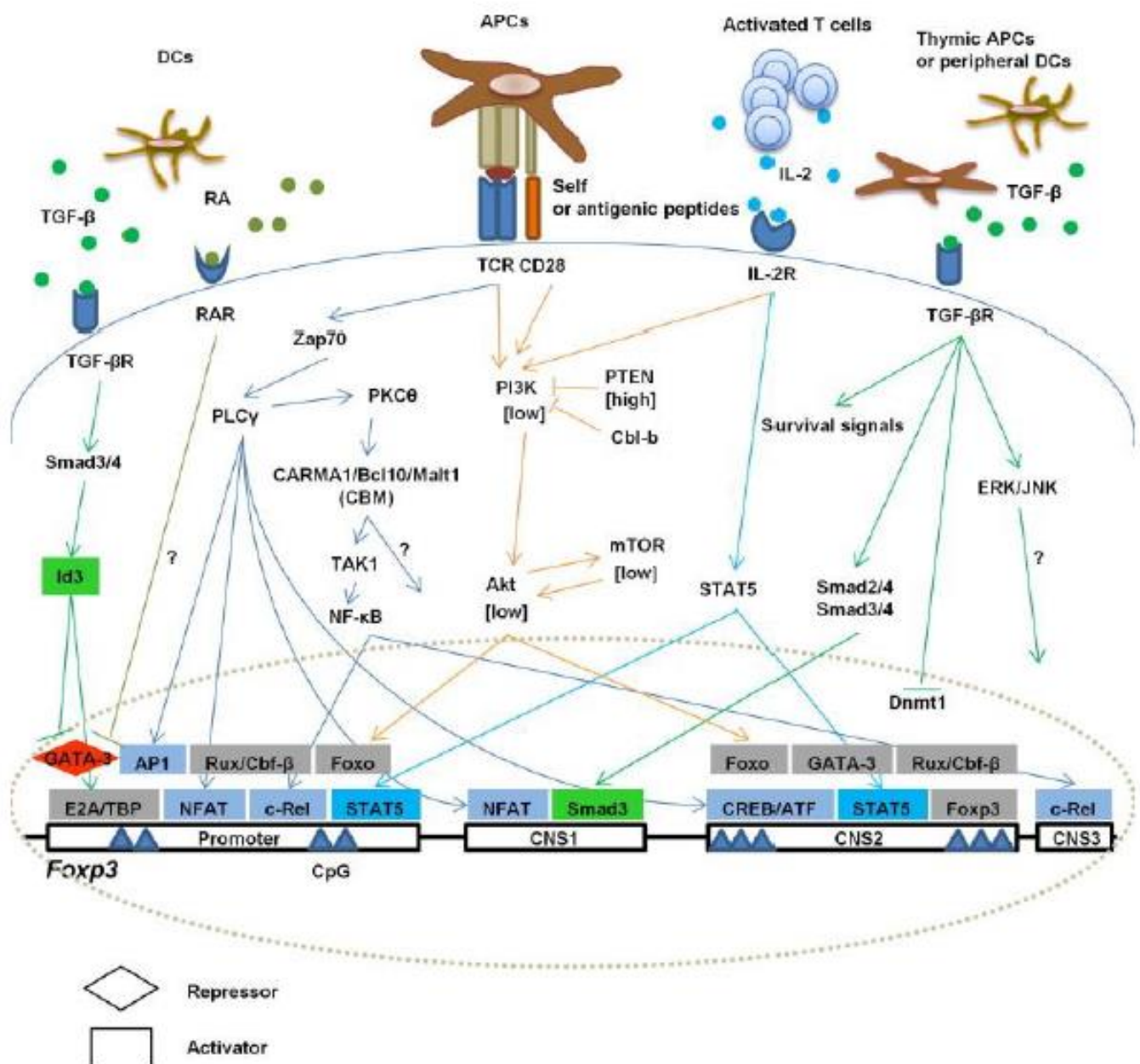


Figure 8 : Différents facteurs induisant l'expression de Foxp3 dans les Treg issus du Thymus ou induits à la périphérie. Cette figure représente les différentes voies inductrices de Foxp3 dans les Treg d'origine thymique mais aussi dans les Treg induits. Pour les Treg induits, en plus du signal induit par le TCR et l'IL-2 dans les Treg thymiques, le TGF-β produit par les APC activent les voies smad2/3 qui favorisent l'expression de Foxp3. D'après (Yuan and Malek, 2012).

2 : Les Treg induits par le TGF- β .

La découverte de l'expression de Foxp3 comme marqueur des Treg a permis d'affirmer que des LT CD4⁺ naïfs peuvent également se différencier en Treg à la périphérie et exprimer Foxp3. *In vivo*, l'administration d'antigènes en absence d'adjuvant sous forme tolérogène à des souris exprimant un TCR spécifique de cet antigène restreint au CMH-II peut induire des Treg (*Apostolou and von Boehmer, 2004*). *In vitro*, la stimulation de LT naïfs par des anticorps anti-CD3 anti-CD28 et en présence de TGF- β et d'IL-2 permet l'expression de Foxp3 parmi les LT mis en culture qui deviennent alors des Treg (*Davidson et al., 2007*). En règle générale, la différenciation des Tconv en iTreg se produit lorsque l'activation est sub-optimale, soit parce que le signal TCR est faible, soit en présence de signal de co-stimulation inhibiteur fort (CTLA-4, PD-1). D'ailleurs, la présence d'une forte co-stimulation induite par CD28, GITR ou encore OX40, de même que la présence de certaines cytokines inflammatoires comme l'interféron- γ (IFN- γ) ou le "Tumor necrosis Factor α " (TNF- α) vont inhiber la différenciation des iTreg. Ainsi les facteurs influençant l'induction des Treg en périphérie sont variés. En effet, l'induction des iTreg ont besoin d'un signal TCR de faible intensité. Des études ont montré que l'induction des Treg se produit en présence de faibles doses d'antigènes mais de forte affinité (*Gottschalk et al., 2010; Kretschmer et al., 2005*). Outre le rôle du TCR, l'induction des iTreg nécessite un signal d'activation faible. Ainsi des études ont montré que la conversion de LT naïfs en iTreg requière une faible activation CD28 (*Guo et al., 2008*). De plus le blocage de CTLA-4 est défavorable à la production des iTreg (*Zheng et al., 2006*). Le TGF- β lui-même est bien entendu l'un des facteurs essentiels à l'induction des Treg *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, le TGF- β permet la production des iTreg même sous des conditions de forte activation des LT (*Gottschalk et al., 2010*). Le TGF- β agirait directement sur les LT en favorisant le signal smad3 qui se fixe sur la région CNS1 du promoteur de Foxp3 (*Tone et al., 2008*) (**Figure 8**). Toutefois le TGF- β ne semble pas être le seul facteur essentiel à la production d'iTreg. L'IL-2 joue aussi un rôle en activant la voie STAT5. Une étude récente a montré que certaines cellules de la rate et des ganglions ayant le phénotype CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻CD62L^{int}CD69⁺ sont des précurseurs immédiats des iTreg en périphérie. En effet lorsque ces cellules sont cultivées avec de l'IL-2 seule, signal TCR, la moitié d'entre elles exprime Foxp3 après seulement 48h. (*Schallenberg et al., 2010*). De même, la RA ou certaines bactéries commensales peuvent aussi agir en synergie avec le TGF- β pour induire

des iTreg dans l'intestin (*Mucida et al., 2007*). Ces cellules participent à la tolérance orale en agissant principalement sur les muqueuses intestinales, mais aussi dans les greffes et dans les maladies inflammatoires chroniques (*Curotto de Lafaille et al., 2008; Izcue et al., 2008*).

Bien qu'on n'ait pas de valeur précise, du fait de l'absence de marqueur permettant de distinguer les Treg thymiques des iTreg, on estime que les premiers seraient 2 à 3 fois plus nombreux que les derniers à l'état basal (*Hsieh et al., 2006; Thornton et al., 2010*).

En comparaison avec les Treg thymiques, le développement des iTreg semble plus varié. Malgré le fait que ces cellules apportent de nouvelles perspectives thérapeutiques, il me semble qu'elles auraient un rôle plus important en conditions inflammatoires que dans le contrôle des lymphocytes auto-réactifs à l'état basal.

D : La stabilité de l'expression de Foxp3.

Foxp3 est l'un des marqueurs les plus importants de la fonction suppressive des Treg. Comme abordé précédemment, les Tconv naïfs peuvent se différencier en cellules régulatrices. Mais les Treg peuvent-ils se différencier en Tconv ? Les avis divergent. Il semble que ce phénomène apparaisse dans certaines conditions inflammatoires et ne soit que transitoire. Certaines études montrent que les Treg peuvent perdre Foxp3 et devenir des Tconv (*Komatsu et al., 2009*). En effet, *in vitro*, la mise en culture de Treg en présence d'IFN- γ ou d'IL-17 façonne les Treg jusqu'à ce qu'ils perdent leur fonction suppressive et produisent des cytokines inflammatoires (*Xu et al., 2007; Zhao et al., 2011*). Dans des modèles de souris lymphopéniques, l'injection d'un mélange de Treg foxp3^{GFP} et de Tconv montre qu'une partie des cellules GFP perdent Foxp3 et sécrètent de l'IL-2, de l'IL-7 et de l'IFN- γ (*Duarte et al., 2009; Wang et al., 2010b*).

Pour pouvoir mieux appréhender *in vivo* ce phénomène, les équipes de J Bluestone et d'A Rudensky ont créé un modèle de souris, Foxp3^{cre-GFP} X Rosa 26^{flox-YFP}. Dans ce modèle l'induction de Foxp3, même transitoire, conduit à l'expression irréversible de l'YFP alors que celle de la GFP est strictement restreinte aux cellules exprimant Foxp3. J Bluestone et ses collaborateurs montrent que 15% des cellules YFP qui ont exprimé Foxp3 ne sont plus GFP, il les a nommées "ex-Treg". Elles présentent des caractéristiques de Tconv pathogènes puisqu'elles sécrètent fortement de l'IFN- γ et peuvent induire un diabète (*Zhou et al., 2009*). Cette caractéristique fut remise en question par l'équipe d'A Rudensky, dans un modèle équivalent, mais dans lequel une expression faible de Foxp3 ne suffit pas à induire

l'expression de l'YFP. Dans ce modèle il n'y aurait que très peu de conversion de Treg en Tconv (*Rubtsov et al., 2010*). Toutefois, un travail récent du groupe de Hori permet de réconcilier les travaux en apparence contradictoires des groupes de J Bluestone et d'A Rudensky. Il est montré que Foxp3 peut être exprimé de façon transitoire et faible par les Tconv (*Miyao et al., 2012*).

Nous avons vu précédemment que l'expression stable de Foxp3 peut être attribuée au caractère déméthylé de la région CNS2 du gène Foxp3. La perte de Foxp3 dans les Treg peut être attribuée à une population mineure de cellules présentant une région CNS2 trop méthylée, (*Miyao et al., 2012*).

D'autre part, des études ont montré que des signaux intrinsèques peuvent moduler l'expression de Foxp3 et leur fonction. Par exemple le facteur « Hypoxia Inducible Factor 1 » (HIF1) régule la balance Treg et Th17 (*Dang et al., 2011*). HIF1 est spécifiquement exprimé dans les Th17 et son induction est contrôlée par la voie de signalisation mTOR (*Shi et al., 2011*). HIF1 contrôlerait donc le développement des Treg en ciblant le facteur de Foxp3 pour l'orienter vers une voie de dégradation par le protéasome.

III: Les mécanismes de suppression exercés par les Treg.

Les Treg vont réprimer la réponse immune et induire la tolérance en agissant sur divers types cellulaires comme les LT, LB, NK, monocytes/macrophages... D'un point de vue fonctionnel, les différents mécanismes de suppression utilisés par les Treg peuvent se regrouper en 4 grands modes d'action : (i) la suppression par la sécrétion de cytokines, (ii) la cytolyse ; (iii) la modulation du métabolisme des LT, (iiii) l'inactivation des cellules dendritiques (**Figure 9**).

A : Les cytokines anti-inflammatoires.

1 : L'IL-10.

L'IL-10 est une cytokine inhibitrice de la réponse immune. Elle n'est pas uniquement synthétisée et sécrétée par les Treg mais aussi par de nombreuses autres populations du système immunitaire comme les LT Th1 et Th2, DC et LB (*O'Garra and Vieira, 2007*). L'IL-10 participe au contrôle de l'auto-immunité. Les souris déficientes en IL-10 développent un syndrome auto-immun (*Kuhn et al., 1993*). Comme déjà décrite précédemment, cette cytokine

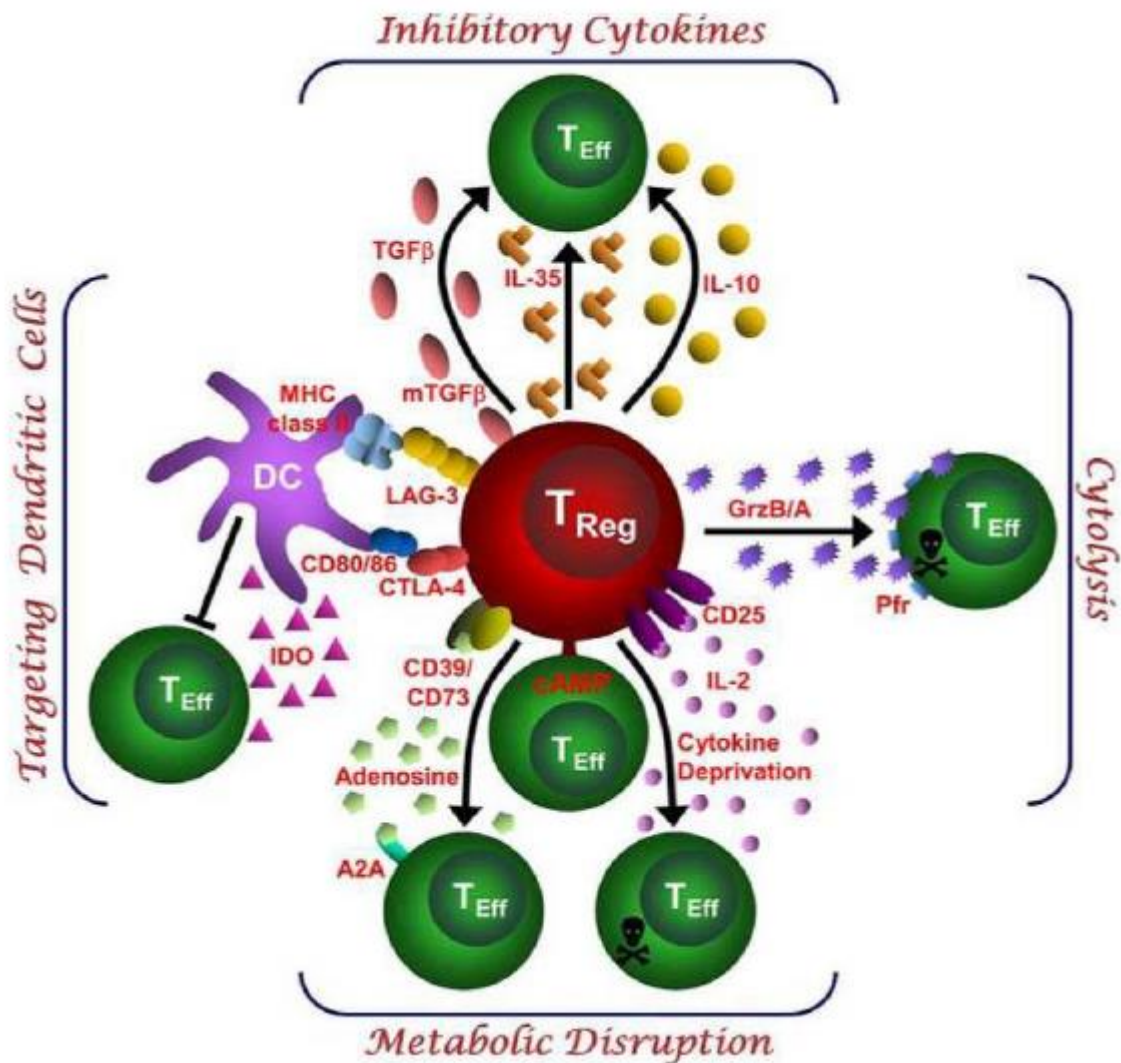


Figure 9. Mécanismes de suppression exercés par les Treg. Ce schéma représente les quatre modes basiques de suppression exercés par les Treg. Un premier mode de suppression est médié par la sécrétion de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10, l'IL35 et le TGF-β. Les Treg peuvent aussi induire la lyse des cellules via la sécrétion de granzyme (GrzB/A) et de perforine (Pfr). Ils peuvent aussi perturber le métabolisme des Tconv par la privation en IL-2 induisant la mort des Tconv ou en perturbant le métabolisme de l'ATP par CD39/CD73. Enfin, les Treg modulent aussi la maturation des DC ou leur fonction via les molécules de co-stimulation CD80/CD86 et CTLA-4, via l'interaction de LAG-3 avec le CMH-II ou encore en induisant l'expression de IDO par les DC. (cAMP= cyclic adenosine monophosphate, A2A= adenosine-purinergic adenosine receptor). D'après (Workman et al., 2009).

a la capacité d'induire la différenciation de cellules régulatrices, les Tr1. L'effet inhibiteur de cette cytokine est en grande partie dû à sa capacité de modifier les CPA.

L'IL-10 produite par les Treg eux-mêmes a un rôle dans la tolérance, plus particulièrement au niveau des muqueuses. En effet, les souris $\text{Foxp3}^{\text{cre}} \times \text{IL-10}^{\text{fl/fl}}$ qui possèdent des Treg déficients en IL-10 ne présentent pas un syndrome auto-immun généralisé mais développent une colite. En contact avec des allergènes ces souris développent aussi une inflammation des voies respiratoires et de la peau (*Rubtsov et al., 2008*). En accord avec ces données, d'autres travaux montrent que l'IL-10 produit par les Treg exprimant STAT3 est nécessaire pour supprimer les Th17 pathogènes de l'intestin (*Chaudhry et al., 2011*).

En résumé, selon les modèles d'auto-immunité, l'IL-10 agit à la fois sur les Treg et sur d'autres cellules pour exercer son action suppressive.

2 : L'IL-35.

L'IL-35 est une cytokine inhibitrice décrite récemment. Elle est composée de deux hétéro-dimères Ebi3 (Epstein-Barr virus-induced gene3) et IL-12 α (connu aussi sous le nom de p35) de la famille des cytokines de l'IL-12. L'IL-35 est préférentiellement exprimée dans les Treg murins. Cette cytokine participe aux mécanismes de suppression des Treg. En effet les Treg issus de souris $\text{Ebi3}^{-/-}$ ou $\text{IL12}\alpha^{-/-}$ présentent une capacité suppressive réduite *in vitro*, et ne peuvent pas contrôler la colite (*Collison et al., 2007*). Il semble que la transduction de l'IL-35 à des Tconv leur confère des capacités suppressives *in vitro*. Cependant l'importance de l'IL-35 *in vivo* serait limitée et reste encore à être clairement définie.

3 : Le TGF- β .

La famille des facteurs "Transforming Growth Factor" TGF est composée de protéines de type facteurs de croissance, qui influencent la croissance et la différenciation de nombreux types cellulaires (*Roberts et al., 1986*). Parmi elles, le TGF- β est présent sous deux formes : une forme latente composée d'un dimère associé à des protéines et une forme, active dépourvue de ces protéines. Le TGF- β est une cytokine immuno-régulatrice avec des fonctions pléiotropes. Il est admis depuis longtemps que le TGF- β a un rôle prépondérant dans la tolérance. Une déficience pour le gène codant pour le TGF- β 1 induit un syndrome auto-immun généralisé (*Shull et al., 1992*). Inversement, une expression constitutive du TGF- β

dans le pancréas de la souris NOD prévient le diabète (*Moritani et al., 1998*). Il semble que la suppression induite par le TGF- β est dépendante des Treg ; toutefois les données de la littérature sont discordantes. *In vitro*, certains travaux montrent que la suppression des Treg est indépendante du TGF- β (*Piccirillo et al., 2002*) ; d'autres affirment que le TGF- β sous sa forme membranaire supprime la prolifération des Tconv *in vitro* (*Nakamura et al., 2001*). *In vivo*, le TGF- β permet l'induction de Foxp3 parmi les CD4 et participe ainsi au maintien des Treg, en particulier dans l'intestin (*Li et al., 2006*). L'équipe d'A Rudensky a montré l'importance de l'expression du récepteur de type II au TGF- β sur les LT CD4. En effet les Tconv issus de souris déficientes pour ce récepteur qui ne peuvent pas répondre au TGF- β ont une expression augmentée du TNF- α et de l'INF- γ conduisant à une auto-immunité létale (*Marie et al., 2006*). L'équipe de R Flavell a montré dans un modèle de diabète induit par l'injection de LT CD8⁺, que celui-ci peut être inhibé lorsque ces cellules sont co-transférées avec des Treg. En revanche, si les LT CD8 transférés sont déficients pour le TGF- β RII, les Treg ne peuvent pas réguler la maladie (*Green et al., 2003*). Enfin, dans un modèle de colite F Powrie a montré que les Treg TGF- β ^{-/-} ont une capacité suppressive moins importante que les Treg WT, même si elle reste efficace (*Fahlen et al., 2005*).

Ainsi, dans certains contextes, le TGF- β produit par les Treg participe à la fonction suppressive de ces cellules.

B : La cytolyse directe des cellules cibles.

La lyse des cellules par la sécrétion de granzyme est une propriété qui a longtemps été attribuée uniquement aux cellules NK et LT CD8 cytotoxiques. Or chez l'homme, les LT CD4⁺ présentent aussi cette caractéristique. Par conséquent, les chercheurs ont considéré l'éventualité de l'existence d'une fonction cytotoxique des Treg. C'est ainsi que l'expression de Granzyme A fut découverte chez les Treg humains (*Grossman et al., 2004*). Chez la souris, il a été décrit que le Granzyme B (GrB) est exprimé par les Treg après activation *ex vivo*. (*Gondek et al., 2005*). De plus, les Treg déficients en GrB ont une fonction suppressive atténuée *in vitro*. *In vivo* chez la souris, il a été démontré que les Treg suppriment la réponse anti tumorale en tuant les LB, les NK, les DC et CTL via la GrB (*Boissonnas et al., 2010; Cao et al., 2007*).

C : Le blocage du métabolisme des lymphocytes T conventionnels.

Outre les mécanismes de cytolyse directe, d'autres molécules sont utilisées par les Treg pour inhiber les Tconv activés.

1 : La privation en IL-2.

Comme abordé précédemment, l'un des marqueurs principaux des Treg est l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2. Cette cytokine est indispensable à leur survie et à leur prolifération. Etant non producteurs d'IL-2, les Treg ont besoin constamment de l'IL-2 exogène produite par les DC et les Tconv. Chez la souris, des études *in vitro* ont montré que la consommation en IL-2 par les Treg est un des mécanismes de suppression. Il y aurait une compétition pour l'IL-2 entre les Treg et les Tconv. La consommation de la majorité de l'IL-2 environnante par les Treg entraînerait l'apoptose des Tconv via l'activation du facteur apoptotique Bim (*Pandiyani et al., 2007*). Toutefois, une étude menée chez l'homme suggère que la consommation d'IL-2 n'est pas le seul mécanisme de suppression lié à cette cytokine. Il semblerait que l'IL-2 favorise aussi directement les capacités suppressives des Treg. L'IL-2 serait nécessaire pour la fonction suppressive des Treg et la consommation de l'IL-2 environnant les Tconv ne serait que secondaire (*Tran et al., 2009b*).

En résumé, il semble que les Treg, par leur affinité et leur appétence pour l'IL-2, inhibent les Tconv eux-mêmes producteurs d'IL-2. Ceci laisse supposer qu'il existe un mécanisme de rétrocontrôle via l'IL-2 régulant à la fois les Treg et les Tconv.

2 : Le métabolisme de l'ATP.

Les Treg peuvent utiliser d'autres mécanismes bloquant le métabolisme des Tconv. Suite à un dommage tissulaire, l'ATP des cellules est libéré, ce qui peut activer les Tconv (*Yip et al., 2009*). Un des mécanismes de suppression des Treg est lié à l'expression membranaire des ecto-enzymes le CD39 (nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1) et le CD73 (ecto-5-nucléotidase) (*Deaglio et al., 2007*). Le CD39 permet la dégradation de l'ATP en Adenosine Mono Phosphate (AMP) dans le milieu extracellulaire environnant et le CD73 permet la dégradation de l'AMP en adénosine. L'adénosine produite supprime les Tconv via l'activation de la signalisation de l'adénosine récepteur 2A (*Deaglio et al., 2007*). L'adénosine favorise aussi les iTreg en inhibant la production d'IL-6 et en favorisant la sécrétion de TGF-

β (Zarek *et al.*, 2008). D'autre part l'AMPc est plus fortement exprimée dans les Treg que dans les Tconv. Cette caractéristique est due au faible taux dans les Treg de l'enzyme phosphodiesterase PDE3B, responsable de la dégradation de l'AMPc (Gavin *et al.*, 2007). Des expériences *in vitro* et *in vivo*, ont montré que les Treg ont la capacité de transférer l'AMPc aux Tconv via des jonctions GAP (Bopp *et al.*, 2007). Ce transfert cause l'activation d'un répresseur transcriptionnel ICER (Inducible CAMP Early Repressor) qui inhibe la prolifération et la production d'IL-2 des LT (Bodor *et al.*, 2001).

D'autres molécules comme les galectines 1 et 10 peuvent aussi participer à la suppression exercée par les Treg. Les galectines font partie de la famille des β -galactosides. On les retrouve sous forme d'homodimères à la surface des Treg ou sous forme sécrétée. Les galectines se fixent sur le CD45, le CD43 ou le CD7 des Tconv, induisant un arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Garin *et al.*, 2007; Kubach *et al.*, 2007).

D : La suppression de la réponse immunitaire via les DC.

En plus de leur action directe sur les Tconv, les Treg suppriment la réponse immune en utilisant un intermédiaire, les DC. Les Treg peuvent bloquer la maturation des DC.

1 : Présentation des antigènes aux Tconv par les DC.

L'interaction entre les Tconv naïfs et les DC est la première étape de l'activation des lymphocytes. L'utilisation d'imagerie bi-photon *in vivo* a montré que les Tconv non spécifiques des antigènes présentés par les DC ont un temps d'interaction très court avec ces cellules. Inversement, les Tconv spécifiques des antigènes présentés ont une interaction prolongée, et à l'issue de ce contact ils s'activent. Cependant, en présence de Treg ce contact prolongé n'a pas lieu, ce qui pourrait être dû au fait que les Treg ont une plus forte affinité d'interaction avec les DC que les Tconv (Tang *et al.*, 2006). Il y aurait ainsi une compétition entre les Treg et les Tconv vis-à-vis de leur interaction avec les DC (Tadokoro *et al.*, 2006). Par des études *in vitro* il a été démontré que les Treg interagissent préférentiellement avec les DC via la surexpression des molécules d'adhésion "Leukocyte Function- associated-Antigen 1" (LFA-1) et ICAM-1, (Onishi *et al.*, 2008) tout comme la neuropiline -1 (Sarris *et al.*, 2008).

En plus de cette compétition, les Treg ont un effet inhibiteur sur la maturation des DC *in vivo* (Onishi *et al.*, 2008) et *in vitro* (Cederbom *et al.*, 2000). Les Treg vont par la suite inhiber l'expression des molécules de co-stimulation CD80/CD86. D'autres études proposent que

LAG-3, un homologue du CD4 qui est fortement exprimé par les Treg, induit un signal inhibiteur lors de sa fixation avec le p-CMH (*Huang et al., 2004*).

2 : CTLA-4 et IDO.

Nous avons vu précédemment que les Treg expriment le CTLA-4 à l'état basal. L'absence de CTLA-4 spécifiquement dans les Treg chez la souris induit une forte lymphoprolifération et un syndrome auto-immun (*Wing et al., 2008*). Comme le CD28, le CTLA-4 se fixe au CD80 et au CD86 mais avec une affinité supérieure. Cette reconnaissance commune induit une compétition entre les Treg et les Tconv. La fixation du CTLA-4 induit un phénotype immature des DC qui se manifeste par une diminution de l'expression de CD80 et CD86 (*Oderup et al., 2006*). D'ailleurs une étude récente a montré que les Treg via le CTLA-4 peuvent directement arracher les molécules CD80/86 membranaires par trans-endocytose, expliquant ainsi en partie la diminution de l'expression de ces récepteurs (*Qureshi et al., 2011*). De plus, l'interaction des Treg avec les DC via le CTLA-4 engendre une expression de l'intégrine $\alpha\beta 8$ activant le TGF- β , initialement sous forme latente (*Zheng et al., 2006*).

Les Treg via la CTLA-4 augmentent l'activité enzymatique d'IDO, une enzyme qui catalyse le tryptophane (*Fallarino et al., 2003*). Il en résulte une privation de l'environnement en tryptophane, acide aminé essentiel à la survie et à la prolifération cellulaire. De plus le catabolite du tryptophane (la kynurenine) est toxique pour les Tconv et peut favoriser la génération des Treg (*Mezrich et al., 2010*). Enfin, une étude récente montre qu'IDO confère directement un phénotype régulateur aux pDC (*Pallotta et al., 2011*).

E : Dans quelles conditions et par quels moyens les Treg suppriment les Tconv?

Selon S Sakaguchi, les Treg utiliseraient différents mécanismes de suppression en fonction du contexte inflammatoire (*Yamaguchi et al., 2011*).

A l'état basal, le rôle principal des Treg dans la suppression de la réponse immune serait la privation des molécules participant à l'activation des Tconv. Ceci se manifeste principalement par la privation en IL-2, par l'atténuation de l'expression des molécules de co-stimulation ou encore par la dégradation de l'ATP induit par CD39/73. Ces mécanismes de suppression auraient un effet de rétrocontrôle permettant aussi de réguler l'homéostasie des

Treg, en particulier par la consommation de l'IL-2 et l'expression des molécules de co-stimulation.

En condition inflammatoire, les Tconv fortement activés pourraient devenir réfractaires à la suppression médiée par les Treg. De plus, certains facteurs de l'inflammation, comme des ligands des TLR ou des cytokines inflammatoires, pourraient entraîner une diminution partielle de la fonction suppressive des Treg. Pourtant la fonction suppressive reste importante, notamment pour permettre une résolution de l'inflammation. Dans ces conditions, les mécanismes de privations suppressions des Treg de type privation, s'avèrent peu efficaces ou insuffisants. L'activité suppressive des Treg est alors augmentée par la synthèse de molécules comme IL-10, le TGF- β , l'IL-35 ou encore la production de granzyme et de perforine. Dans ces conditions on pourrait même observer une conversion des Tconv activés en LT producteurs de cytokines suppressives ou en Treg induits.

Malgré ces divers mécanismes de suppression exercés par les Treg, certains composants de l'inflammation pourraient rendre les Tconv complètement réfractaires à la suppression par les Treg (*Shimizu et al., 2002*). Ceci pourrait expliquer la rupture de la tolérance et l'apparition d'une auto-immunité.

F : L'effet inhibiteur "Bystander".

Les Treg s'activent quand ils sont stimulés par leur antigène cognitif. L'activation d'un Treg se fait lorsqu'il reconnaît son antigène spécifique. Les Treg ont la capacité d'inhiber des Tconv spécifiques d'autres antigènes *in vitro*. On appelle cette caractéristique des Treg l'effet "bystander" ou non antigène spécifique. Une première démonstration de cet effet fut faite par l'équipe de S Sakaguchi. *In vitro*, les Treg spécifiques de l'ovalbumine OVA₃₂₃₋₃₃₉ sont capables d'inhiber la prolifération de Tconv spécifiques de OVA₂₇₈₋₂₈₅ (*Takahashi et al., 1998*). Ces données ont été confirmées *in vitro* (*Thornton and Shevach, 2000*) et *in vivo* (*Yu et al., 2005*). Par exemple, dans un modèle de colite, des Treg issus de souris TCR transgéniques spécifiques pour un antigène (TNP) sont capables de contrôler la maladie induite par un autre antigène (*Elinav et al., 2008*).

D'autre part, le transfert adoptif de Treg TCR transgéniques spécifiques d'un antigène d'îlots pancréatiques, issus de souris BDC2.5, à des souris diabétiques induit la rémission de la maladie (*Tang et al., 2004b*). Cette rémission serait à l'origine d'un effet "bystander" des Treg, puisque la destruction des îlots pancréatiques est due à l'action conjuguée de plusieurs

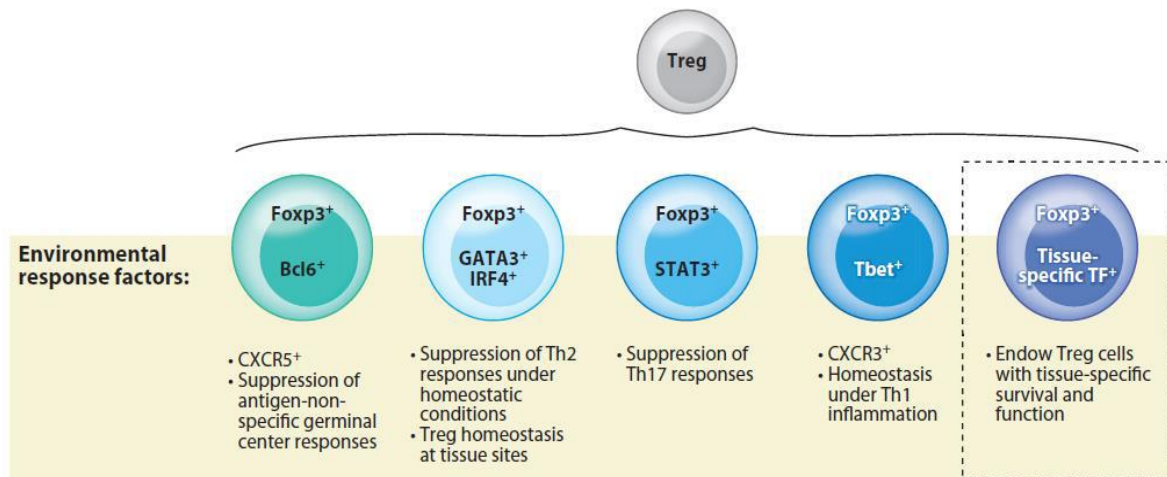


Figure 10. Le “classe contrôle”. Les Treg peuvent se spécialiser selon leur environnement en exprimant certains facteurs de transcription. Ainsi les Treg exprimant STAT3 vont réguler préférentiellement les Th17, les Treg Tbet⁺ vont réguler les Th1, les Treg IRF-4⁺ et les Th2. Issu de (Josefowicz *et al.*, 2012).

clones de Tconv différents. (IGRP, GAG, BDC...). Dans ce cas, les Treg BDC2.5 activés *in vivo* dans le ganglion drainant ou directement dans le pancréas seraient capables d'inhiber les différents clones de Tconv de spécificités variées. Différents mécanismes de suppression sont utilisés pour inhiber la réponse immune.

G : Le “ Classe contrôle ”.

Les Treg ont la particularité de contrôler une grande variété de réponses immunes, qu'elles soient d'origines auto-immunes, anti-inflammatoires ou dirigées contre des agents pathogènes. Ces dernières années, de nombreux travaux suggèrent que certains types de mécanisme de suppression utilisé par les Treg dépendraient de l'environnement, c'est-à-dire du tissu ou du type d'inflammation. Ainsi les Treg se spécialiseraient selon le type de tissu qu'ils infiltrent ou selon le type d'inflammation. Par exemple, les souris possédant des Treg IL-10^{-/-}, présentent une forte inflammation spécifiquement dans l'intestin et la peau (*Rubtsov et al., 2008*). Cette hypothèse se base sur l'étude fonctionnelle de facteurs de transcriptions exprimés par les Treg et les LT (**Figure 1O**).

Le facteur de transcription “ Interferon Regulatory Factor 4 ” (IRF-4), sollicité dans la différenciation des Tconv en Th2, peut former un complexe avec Foxp3 dans les Treg. De cette interaction résulte une expression particulière de certains gènes induits par Foxp3 visant à supprimer préférentiellement les Th2. En effet, des travaux récents ont montré qu'une ablation conditionnelle d'IRF-4 dans les seuls Treg les rendent incapables de supprimer les Th2. Ceci se manifeste par une augmentation de la production d'immunoglobulines (Ig) dans le plasma (*Zheng et al., 2009*). Par ailleurs une mutation délétère de IRF-4 empêche l'activation des Treg et altère l'expression de Foxp3 (*Cretney et al., 2011*). D'autres études ont montré que la co-expression de Foxp3 et de Tbet permet aux Treg de mieux contrôler les réponses de type Th1, Tbet étant un facteur de transcription prédominant dans la différenciation des Th1. Ainsi les Treg Tbet^{-/-} sont incapables d'inhiber les réponses de type Th1, en particulier parce qu'ils n'expriment pas le récepteur CXCR3 permettant de migrer dans les tissus inflammatoires riches en IFN-γ (*Koch et al., 2009*). De plus il semble que les Treg Tbet^{-/-} soient capables de supprimer les réponses de type Th2 ou Th17 montrant ainsi la spécificité fonctionnelle des Treg Tbet⁺. Des travaux similaires ont montré ces mêmes caractéristiques avec les Treg STAT3⁺ dans la régulation des réponses de type Th17 (*Chaudhry et al., 2009*), ou encore des Treg Bcl6⁺ pour l'inhibition des LT “ helper

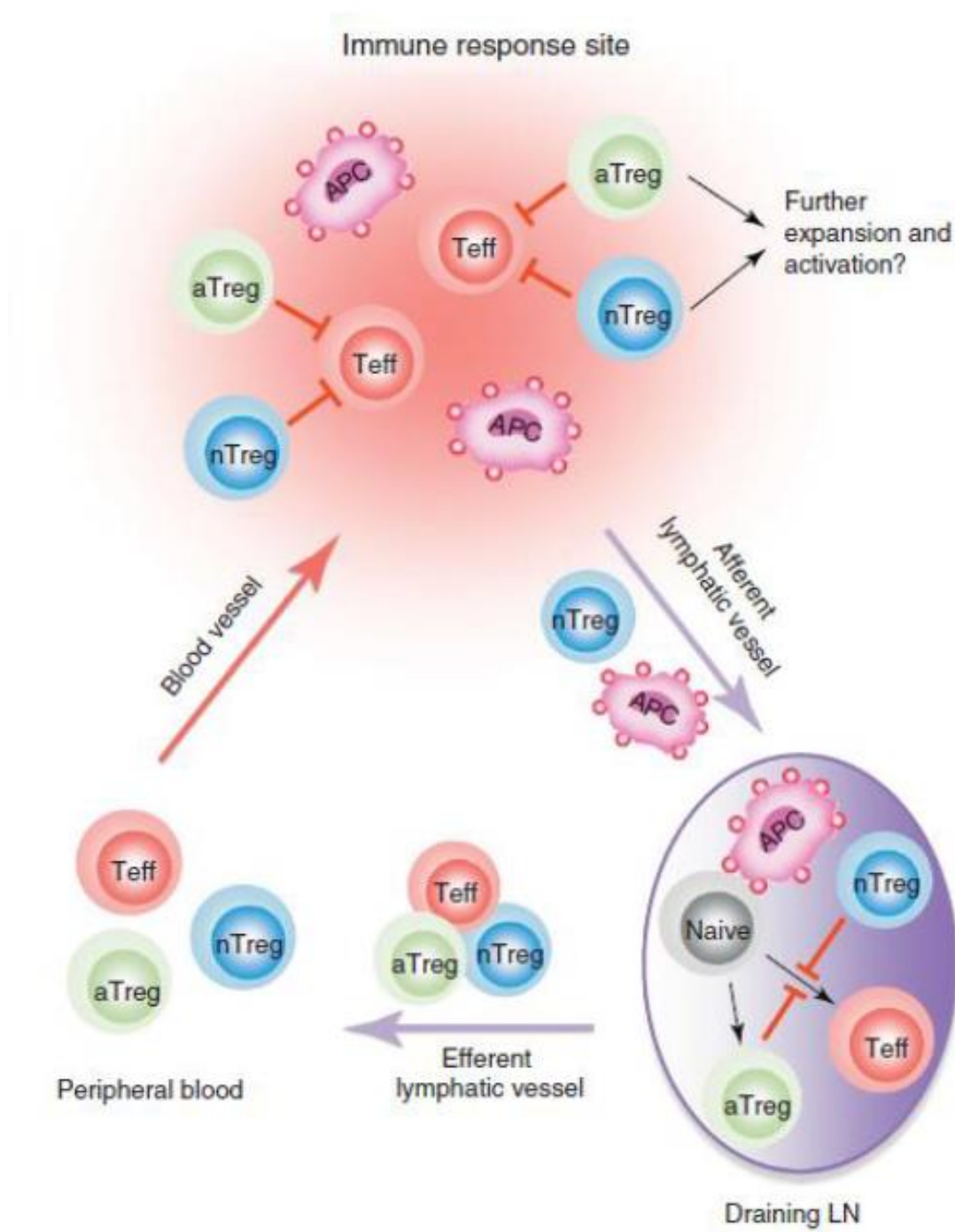


Figure 11. Circulation des Treg pendant la réponse immune. Les Treg “naïfs” vont circuler dans le sang, les tissus et le réseau lymphatique secondaire. Lors de la réponse immune, les Treg vont entrer en contact avec les APC et s’activer. En cas d’inflammation, les Treg vont migrer plus rapidement et être recrutés dans le tissu afin de contrôler la réponse immune. Issu de (Ding *et al.*, 2012).

folliculaire” (Tfh) (*Chung et al., 2011; Linterman et al., 2011*). Enfin l’équipe de D. Mathis et C. Benoist a montré que les Treg infiltrant les tissus adipeux n’ont pas la même signature moléculaire que ceux des ganglions (*Feuerer et al., 2009a; Winer et al., 2009*). Par exemple ces Treg expriment le récepteur “ Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ ” (PPAR- γ) qui est essentiel à leur fonction et à leur homéostasie dans les tissus adipeux (*Cipolletta et al., 2012*).

L’ensemble de ces travaux suggère que les Treg peuvent s’adapter à l’environnement et se “ spécialiser ”, probablement pour être particulièrement efficaces pour réguler un type spécifique de réponse immune.

IV : Homéostasie et Fonction suppressive des Treg.

A : Activation et migration des Treg.

1 : Activation des Treg.

Un travail important a montré qu’au sein des Treg il existe deux sous-populations : les Treg au repos qui sont caractérisés par une expression intermédiaire de CD44, une absence d’expression d’OX40, de CD69, de Ki67 ou du TNFR2 et qui sont CD62L^{high}; et les autres appelés Treg “activés mémoires” exprimant CD44^{high} CD62L^{low} et dans lesquels les marqueurs suivants sont augmentés : ICOS, Ki67, TNFR2, OX40, CD137 (*Fisson et al., 2003; Huehn et al., 2004*). Ces Treg activés mémoires prolifèrent, se divisent activement et semblent être responsables de l’inhibition précoce de la réponse tumorale (*Darrasse-Jeze et al., 2009a*). D’autre part, des études plus récentes ont montré que les Treg activés mémoires, sur la base de l’expression du TNFR2 ou de ICOS, sont plus suppresseurs que les Treg au repos (*Chen et al., 2010b; Chen et al., 2012*).

2 : Localisation, Trafic et migration des Treg.

2a : A l’état basal.

Les Treg issus du thymus représentent 10 à 15% des LT CD4⁺ dans les organes lymphoïdes secondaires à l’état basal. Comme les autres LT, les Treg recirculent entre le sang, la rate, et vont migrer dans les tissus (*Tomura et al., 2010*) (**Figure 11**). La migration des Treg n’est pas passive, elle se fait à travers un dialogue entre les chimiokines, leurs récepteurs et les intégrines. Ainsi l’intégrine CD62L (L-selectine) est la molécule cruciale pour le

« homing » des LT dans les ganglions. Il a été démontré que les Treg CD62L^{high} préviennent mieux le diabète que les Treg CD62L^{low}, par leur capacité à coloniser les ganglions pancréatiques (*Ermann et al., 2005*). Comme pour les autres LT, l'entrée et la sortie des ganglions fait aussi appel à CCR7 ou S1P1 (*Chiba et al., 2006*). Il est à noter que certains tissus ont une forte proportion de Treg (20-50%), comme la moelle osseuse ou la graisse, sans qu'on en comprenne la raison. (*Debes et al., 2005; Dudda and Martin, 2004*).

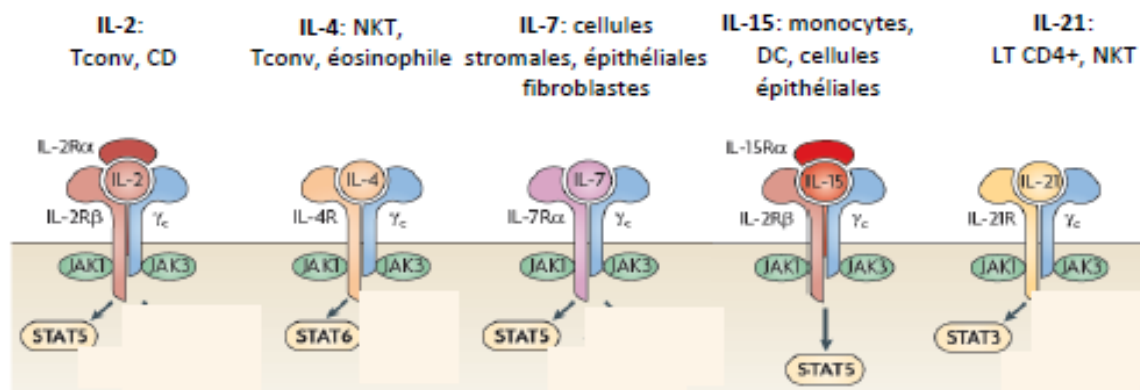
2b : Dans un contexte inflammatoire.

En situation inflammatoire, le comportement des Treg change. L'utilisation d'un modèle de souris exprimant une protéine fluorescente qui change de spectre en présence de lumière violette a permis de montrer que la mobilité des cellules augmente d'un facteur 10 suite à une réaction immune de la peau (*Tomura et al., 2010*). D'après cette étude il semble que les Treg soient plus sensibles à la mobilité que les autres LT. En cas d'inflammation, les Treg comme les Tconv vont migrer préférentiellement vers le site enflammé. On observe même souvent une proportion augmentée de Treg dans ces sites par rapport au 10-15 % trouvés dans la rate et les ganglions à l'état basal. Cet enrichissement en Treg peut s'expliquer par une expression plus forte et plus rapide, par rapport aux Tconv, de certains récepteurs aux chimiokines inflammatoires (CCR2, CCR5, CCR4, CCR6, CCR8) (*Lee et al., 2007*), mais surtout par une forte capacité des Treg à proliférer dans un contexte inflammatoire qui peut s'expliquer par une expression préférentielle de TNFR2, GITR ou OX40 comme décrit précédemment. Dans un modèle de greffe d'îlots, la migration des Treg sur le site de la greffe est essentielle pour avoir un effet protecteur. Ainsi les Treg présentant un déficit pour CCR2, CCR4 ou CCR5 ne pourront pas migrer au site de la greffe et ne protégeront pas le greffon (*Wei et al., 2006*). Dans ce modèle, une autre étude a examiné comment les Treg circulent entre les tissus enflammés et les ganglions pendant la réponse immune. Les Treg présents dans ce greffon vont migrer dans le ganglion drainant via CCR2, CCR5, CCR7 puis y acquérir une augmentation de leur capacité suppressive qui se manifeste par l'augmentation de la production d'IL-10 ou de l'expression de CTLA-4 (*Zhang et al., 2009*).

B : Le rôle de la famille γ C dans la survie des Treg.

La famille des cytokines γ C comprend l'IL-2, 4, 7, 15 et 21. Ces interleukines sont

Cytokine produite par:



Récepteurs exprimés par:

IL-2: Treg, Tconv, LB, NK
 IL-4: Tconv, LB, NK, basophile
 IL-7: LT, pré-LB, DC
 IL-15: LT, LB, DC, NK
 IL-21: LT, LB, DC, NKT

Figure 12. Récepteurs de la famille γ C. Tous ces récepteurs présentent une sous unité commune, la chaîne γ C (CD132) et induisent les voies Jak/STAT. En plus de la chaîne γ C, les récepteurs à l'IL-2 et à l'IL-15 sont constitués de deux autres sous-unités, IL-2R α (CD25), IL-15R α (CD215), et en commun IL-2R β (CD122). Pour les autres récepteurs à l'IL-4, à l'IL-7, et à l'IL-21, ils sont constitués d'une seule autre sous-unité, respectivement nommée IL-4R (CD124), IL-7R α (CD127), IL-21R (CD360). Adapté de (Rochman *et al.*, 2009).

naissance	absence de symptômes
2 semaines	augmentation de la cellularité des ganglions et augmentation de la proportion des LT activés
3-8 semaines	lymphadénopathie, splénomégalie, augmentation des granulocytes dans la moelle osseuse et la rate, présence d'anticorps anti-ADN, infiltration lymphocytaire au niveau de plusieurs organes.
8-12 semaines	aplasie thymique, parfois diminution de la cellularité des ganglions et de la rate, défaut dans le développement des lymphocytes B, mort

Tableau 3. Développement de la pathologie chez les souris C57/Black 6 IL-2R $\beta^{-/-}$.

regroupées dans cette famille car toutes reconnaissent un récepteur contenant la chaîne γC (**Figure 12**). Elles sont impliquées dans le développement, la fonction et l'homéostasie des LT. Je développerai dans cette partie principalement le rôle de l'IL-2, 7 et 15 dans l'homéostasie des Treg.

1: IL-2 : facteur essentiel à la survie des Treg.

Initialement l'IL-2 était connue pour sa capacité à activer et à faire proliférer les LT *in vitro* (*Smith, 1988*). D'ailleurs elle fut nommée pendant longtemps "T cell growth factor". Pourtant les souris invalidées pour l'IL-2 ou pour la sous-unité CD122 de son récepteur (**Figure 12**) ne présentent pas une immunodéficience comme attendu, mais au contraire un syndrome auto-immun accompagné d'une forte lympho-prolifération (*Sadlack et al., 1993; Suzuki et al., 1995*) (**Tableau 3**). Pour expliquer ces résultats surprenants, les chercheurs ont supposé que cette auto-immunité était due à un défaut de mort par AICD des LT auto-réactifs. Plus tard, avec la découverte de l'expression de CD25 comme marqueur des Treg et le fait que les souris IL-2^{-/-}, CD25^{-/-} ou CD122^{-/-} ont un déficit en ces cellules, il a été proposé que l'auto-immunité de ces souris est causée par un déficit en Treg. Ces données sont confirmées par une expérience de transfert adoptif qui montre que l'injection de Treg CD4⁺ CD25⁺ à des souris CD25^{-/-} ou CD122^{-/-} prévient l'auto-immunité (*Sakaguchi et al., 1995*).

Nous avons vu précédemment que l'IL-2 participe à la différenciation thymique des Treg, mais quelle est son action à la périphérie ? De nombreux travaux montrent que l'IL-2 est essentielle pour garantir la survie et l'expansion des Treg. Les premières expériences menées *in vitro* montrent qu'en complément d'une activation du TCR, l'IL-2 stimule la prolifération et induit la survie des Treg (*Thornton and Shevach, 1998*). *In vivo*, il a été montré que les Treg CD122^{-/-} prolifèrent beaucoup moins que les Treg sauvages (*Bayer et al., 2007*). D'ailleurs dans des modèles de souris lymphopéniques, il s'avère que la quantité d'IL-2 produite par les Tconv influence directement l'expansion et la survie des Treg (*Almeida et al., 2002*). D'autre part, en utilisant des souris chimères contenant des cellules CD25^{-/-} et CD25⁺, l'équipe de A Rudensky a observé une absence de cellules foxp3⁺ parmi les CD25^{-/-} en périphérie (*Fontenot et al., 2005b*). Le phénotype des Treg résiduels d'une souris IL-2^{-/-} est anormal, notamment l'expression de CD25 qui y est particulièrement diminuée. L'ensemble

de ces travaux montre clairement l'importance de l'IL-2 et de l'expression de CD25 pour la survie, la prolifération et le maintien du phénotype des Treg.

De façon intéressante, dans un modèle de souris transgéniques développant une EAE spontanée, J Lafaille a montré que le transfert adoptif de LT CD4⁺ issus de souris IL-2^{-/-} prévient l'apparition de la maladie, ce qui n'est pas le cas pour les LT CD4⁺ de souris CD25^{-/-} (*Furtado et al., 2002*). Ces données permettent de supposer que les Treg IL-2^{-/-} seraient capables de répondre à l'IL-2 produite par l'hôte, ce qui leur permettrait de survivre et d'assurer leur fonction suppressive. Plus récemment, les travaux de J Sprent ont montré que l'injection d'une IL-2 stabilisée par un anticorps anti-IL-2 spécifique induit une forte prolifération des Treg en périphérie (*Boyman et al., 2006; Webster et al., 2009*). En effet, la proportion des Treg parmi les CD4⁺ augmente de 10 à 50 % dans la rate. Après l'arrêt du traitement, le pourcentage de ces cellules diminue pour revenir à la normale. D'ailleurs, ils ont aussi observé que cette expansion des Treg est associée à une surexpression de GITR, ICOS et CD103, leur conférant un phénotype activé.

D'un point de vue moléculaire, l'IL-2 active la voie STAT5 qui induit la surexpression des protéines de cycle comme la cycline D3 et c-myc. Il en résulte une induction de la prolifération des Treg. (*Bensinger et al., 2004*). D'autres expériences ont montré que chez la souris NOD, l'expression de l'ARNm de l'IL-2 est réduite dans les Tconv infiltrant le pancréas. Cette réduction quantitative d'IL-2 est corrélée avec la diminution de l'expression d'une molécule anti apoptotique Bcl2 et de CD25 dans les Treg pancréatiques (*Tang et al., 2008*).

Enfin, il semble que l'activation des Treg par l'IL-2 conduise plutôt au recrutement du facteur JAK-3 qui phosphoryle STAT-5 (*Zeiser and Negrin, 2008*). Comme décrit précédemment le promoteur du gène Foxp3 présente des sites de fixation pour STAT-5. L'inhibition de JAK-3 par un inhibiteur, l'AG-490, provoque une diminution de l'expression de Foxp3 (*Murawski et al., 2006*). De plus, il a été récemment décrit qu'*ex vivo*, une fraction des Treg présente une activation continue de STAT-5 (*Goldstein et al., 2011*). L'ensemble de ces données suggèrent que l'IL-2 permet de maintenir l'expression de Foxp3 sur les Treg, via la voie JAK-STAT5.

D'après ces divers travaux, il est clairement défini aujourd'hui que l'IL-2 est indispensable à la survie et à la prolifération des Treg. Les Treg pourraient donc entrer en compétition avec d'autres cellules pour l'IL-2 environnante.

2 : Rôle de L'IL-7, L'IL-15.

L'IL-15 et l'IL-7 induisent aussi l'activation de la voie STAT5, elles peuvent donc potentiellement avoir un rôle dans l'homéostasie des Treg à la périphérie. L'IL-7 est bien connue pour participer au développement et à l'homéostasie des LT naïfs ou mémoire. Cependant, l'implication de l'IL-7 dans l'homéostasie des Treg est débattue. Par exemple, *in vitro*, la présence d'IL-7 permet l'induction de Foxp3 dans les précurseurs thymiques (**Bayer et al., 2008**). On a peu de données montrant un rôle *in vivo* de l'IL-7 sur les Treg, à l'exception d'une étude récente qui suggère qu'à la périphérie l'IL-7 participe au maintien de l'expression de Foxp3 dans les Treg (**Kim et al., 2012**). Toutefois, les souris déficientes pour cette cytokine ou pour le CD127 (récepteur à l'IL-7) ont une profonde réduction de leurs LT mais une proportion de Treg augmentée (**Mazzucchelli et al., 2008**). De façon intéressante, les Treg expriment faiblement le CD127 en comparaison avec les autres populations de LT (**Liu et al., 2006**). Ceci permettrait d'expliquer pourquoi les souris IL-7^{-/-} ou CD127^{-/-} présentent une augmentation des Treg. Cependant, la faible expression du CD127 sur les Treg n'empêcherait pas l'action de l'IL-7 sur ces cellules (**Matsuoka et al., 2013; Yates et al., 2007**). A l'inverse, des travaux menés chez l'homme suggèrent que l'IL-7 abroge leur fonction suppressive (**Heninger et al., 2012**).

En ce qui concerne l'IL-15, cette cytokine possède en commun avec le récepteur de l'IL-2 les sous-unités CD132 et CD122 (**Figure 12**). L'IL-15 semble jouer un rôle mineur dans l'homéostasie des Treg. Un déficit en IL-15 chez des souris mutantes induit une faible diminution en Treg à la périphérie. Cependant, en l'absence d'IL-2, on a un rôle compensatoire de l'IL-15 dans la mesure où les souris IL-2^{-/-} IL-15^{-/-} ont un déficit en Treg beaucoup plus sévère que les souris déficientes pour l'IL-2 seulement (**Burchill et al., 2007**).

Dans l'ensemble l'IL-7 et l'IL-15 ont une influence sur l'homéostasie des Treg, cependant leur rôle reste secondaire en comparaison avec celui de l'IL-2.

C : Le rôle des DC et des pDC dans l'homéostasie des Treg.

1 : Les DC.

Les DC tolérogènes peuvent participer au contrôle de la réponse inflammatoire de différentes manières : soit en agissant directement sur les LT auto-réactifs soit en participant à l'homéostasie des Treg (**Coombes et al., 2007**). Par exemple, les DC peuvent contrôler les

TCD8 auto-réactifs en cross-présentant leur antigènes et en induisant leur mort via une augmentation du signal pro-apoptotique Bim (*Davey et al., 2002*). Il semble que les DC jouent un rôle important dans l'homéostasie des Treg. D'ailleurs une étude montre que les souris déficientes en DC développent une auto-immunité létale. Selon les auteurs, cette auto-immunité est causée par une infiltration lymphocytaire massive dans les organes non lymphoïdes (*Ohnmacht et al., 2009*) ou par un syndrome myélo-prolifératif (*Birnberg et al., 2008*). Chez ces souris, le taux de Treg parmi les CD4 totaux ne change pas, mais le nombre total de Treg diminue. De plus, dans un autre modèle de déplétion conditionnelle de DC (CD11c^{DTR}), la déplétion de ces cellules conduit à une baisse importante de la proportion et du nombre de Treg (*Darrasse-Jeze et al., 2009b*). D'après ces travaux, les DC seraient impliqués dans la survie des Treg. D'autres études suggèrent que les DC participent aussi à la prolifération des Treg à l'état basal (*Suffner et al., 2010*).

Les DC représentent une très grande famille de sous populations, avec des phénotypes variés. D'ailleurs, les DC CD8⁺ ou les DC CD103⁺ semblent préférentiellement favoriser l'homéostasie des Treg. En réponse à l'IFN- γ , les DC CD8⁺ expriment fortement IDO, ce qui permet l'inhibition des LT activés et favorise les Treg (*Grohmann et al., 2003*). De plus, l'administration de "Fms-Like Tyrosine 3-Ligand" (Flt3-L) bien connu pour induire une expansion des DC (CD103⁺ CD11b^{+/+}) entraîne une expansion également des Treg (*Collins et al., 2012*). Dans un modèle murin de maladie de Crohn, le traitement Flt3-L réduit la sévérité de la maladie (*Collins et al., 2012*). Des résultats similaires ont été observés dans un modèle de GvHD (*Swee et al., 2009*).

L'ensemble de ces études suggère qu'une expansion de DC est positivement corrélée à une expansion de Treg. Cependant, on ne peut écarter l'hypothèse que Flt3-L agisse sur d'autres cellules myéloïdes que les DC. Il est important de signaler que les Treg peuvent exercer un rétrocontrôle sur la niche des DC (*Liu et al., 2009*). Enfin, d'autres études montrent que l'expression de molécules de co-stimulation comme CD80/86 sur les DC est essentielle aux Treg (*Bar-On et al., 2011; Salomon et al., 2000*).

En plus du rôle dans l'homéostasie des Treg, différentes études ont mis en évidence plusieurs sous populations de DC spécialisées dans l'induction des iTreg. Une première étude de R Steinman et ses collaborateurs a montré que les DC sont les CPA les plus aptes à induire des iTreg en présence de TGF- β (*Yamazaki et al., 2007*). D'ailleurs le ciblage spécifique d'un antigène vers les DC par les anticorps DEC205 permet une forte induction des

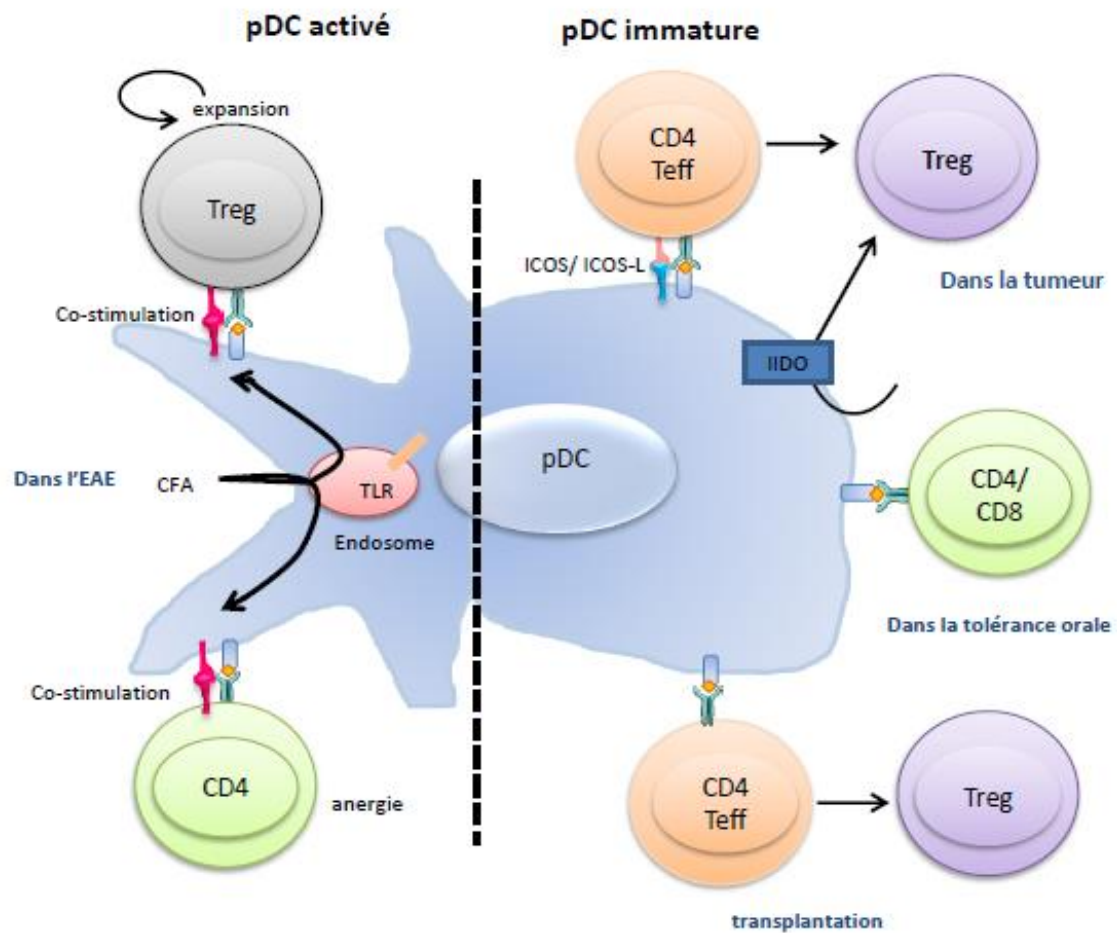


Figure 13. Le rôle des pDC tolérogènes dans l'homéostasie des Treg. Comparaison des pDC tolérogènes activées ou immatures dans l'homéostasie des Treg. Les pDC immatures favorisent l'induction des Treg dans un modèle de tumeur ou de transplantation via IDO et les molécules de co-stimulation ICOS. Dans des modèles de tolérance orale, les pDC induisent l'anergie des LT CD4 et CD8. Les pDC tolérogènes activées dans un modèle d'EAE (Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale) favorisent l'expansion des Treg et induisent l'anergie des Tconv.

Treg (*Kretschmer et al., 2005*). Par la suite, une étude a montré qu'en présence de TGF- β exogène, les DC spléniques CD8 α^+ CD205 $^+$ sont plus efficaces que leurs homologues, CD8 α^- (*Yamazaki et al., 2008*). Ces phénomènes d'induction reposeraient sur les interactions B7/CTLA-4 et PD-1 PD-L1 (*Wang et al., 2008a*). Cette spécialisation des CPA dans la capacité à induire des Treg, semble aussi dépendre de l'organe. En effet l'intestin est un site spécialisé dans l'induction des Treg (*Grainger et al., 2010*). Une étude a montré que les DC issues de la *lamina propria* ou des ganglions mésentériques sont de meilleurs inducteurs de iTreg que les DC issues de la rate (*Coombes et al., 2007*). Notons que les DC issus de la *lamina propria* exprimant l'intégrine CD103 sont capables d'induire des Treg *in vivo* en activant la forme latente du TGF- β (*Coombes et al., 2007*). De plus cette activation serait dépendante de l'intégrine $\alpha\beta 8$. D'ailleurs les souris déficientes pour cette protéine développent un syndrome auto-immun lié à l'incapacité d'induire des iTreg *ex vivo* (*Travis et al., 2007*). Il semblerait aussi que les DC CD103 $^+$ de l'intestin favorisent l'induction de Treg en produisant du TGF- β et de l'acide rétinoïque (RA) (*Sela et al., 2011; Yamazaki et al., 2007*). En général les DC contribuent au maintien des Treg à la périphérie. Ces Treg en retour exerceraient un rétrocontrôle sur la niche des DC.

2 : Les “Plasmacytoid Dendritic Cells” (pDC).

Nous avons abordé le fait que parmi les DC il existe différentes sous-populations de cellules dendritiques. L'une d'entre elles, les pDC, pourrait jouer un rôle important sur les Treg. Ces pDC sont caractérisées par l'expression de BST2, GR-1 et Siglec-H. Les pDC ont une double fonction dans la réponse immunitaire, elles sont capables d'activer d'une part les Tconv, d'autre part elles possèdent aussi une fonction tolérogène (**Figure 13**). Plusieurs études montrent que ces cellules favorisent les iTreg. Par exemple, dans un modèle de GvH, une déplétion des pDC inhibe l'induction des Treg. (*Hadeiba et al., 2008; Ochando et al., 2006*). Dans un modèle de tumeur, il a été décrit que les pDC, via la molécule de co-stimulation ICOS et IDO, inhibent la réponse anti-tumorale en favorisant les iTreg (*Conrad et al., 2012; Sharma et al., 2007*). Inversement, une déplétion d'IDO exprimé par les pDC entraîne l'activation des LT (*Daissormont et al., 2011*). Dans un modèle de tolérance orale, une déplétion des pDC entraîne un blocage de cette tolérance (*Goubier et al., 2008*). De plus, dans un modèle de souris présentant un déficit spécifique et profond en pDC, il est observé une diminution des Treg de la *lamina propria* de l'intestin mais pas dans la rate à l'état basal

(Takagi *et al.*, 2011). Dans un modèle d'EAE, une étude récente a montré que les pDC n'augmentent pas seulement l'induction des iTreg mais favorisent aussi la prolifération des Treg naturels (Irla *et al.*, 2010). L'ensemble de ces travaux montre que selon les conditions inflammatoires et selon leur état d'activation, les pDC participent à l'induction et à l'expansion des Treg (**Figure 13**).

D: Rôle de la famille CD28.

Les CPA interagissent avec les Treg via certains membres de famille CD28. La famille CD28 est composée de différentes molécules de co-stimulation, telles que le CD28, ICOS, CTLA-4 et PD-1. On distingue les molécules délivrant un signal de co-stimulation positif, comme le CD28 et ICOS, de celles délivrant un signal de co-stimulation négatif, comme le CTLA-4 et PD-1 (Wakamatsu *et al.*, 2013).

1: Le CD28.

CD28 est une molécule de co-stimulation exprimée constitutivement par l'ensemble des LT à l'exception de certains LT CD8⁺ chez l'homme. Les ligands de CD28, CD80 et CD86, sont exprimés à la surface des CPA activées. Le CD28 participe à la génération des Treg dans le thymus mais possède aussi un rôle important dans l'homéostasie des Treg à la périphérie. La première démonstration du rôle de CD28 sur les Treg fut observée chez la souris NOD. En effet les souris NOD CD28^{-/-} présentent un déficit en Treg et ont une incidence du diabète augmentée (Salomon *et al.*, 2000). D'autres expériences ont montré que l'administration d'antagonistes de CD80/86 réduit fortement la proportion des Treg à la périphérie, même si les souris sont thymectomisées. Les auteurs ont conclu que CD80/86 participent aussi à l'homéostasie périphérique des Treg (Tang *et al.*, 2003). Les agonistes entraînent aussi une diminution de l'expression de CD25 sur les Treg. Un phénotype similaire est observé dans les souris IL-2^{-/-}. Ces données suggèrent que l'engagement de CD28 peut agir de façon intrinsèque sur les Treg ou via l'IL-2 dans l'homéostasie des Treg. L'équipe d'A Singer a montré que le CD28 pouvait agir de façon intrinsèque sur les Treg. Chez des souris chimères reconstituées avec un mélange de moelles osseuses issues de souris sauvages et de souris IL-2^{-/-} (WT/IL-2^{-/-}) ou de CD28^{-/-} (WT/CD28^{-/-}), il a montré que l'IL-2 produite dans les souris (WT/IL-2^{-/-}) est suffisante pour obtenir une génération de Treg mais pas dans les souris chimères (WT/CD28^{-/-}) (Tai *et al.*, 2005). D'autres travaux renforcent cette idée que le

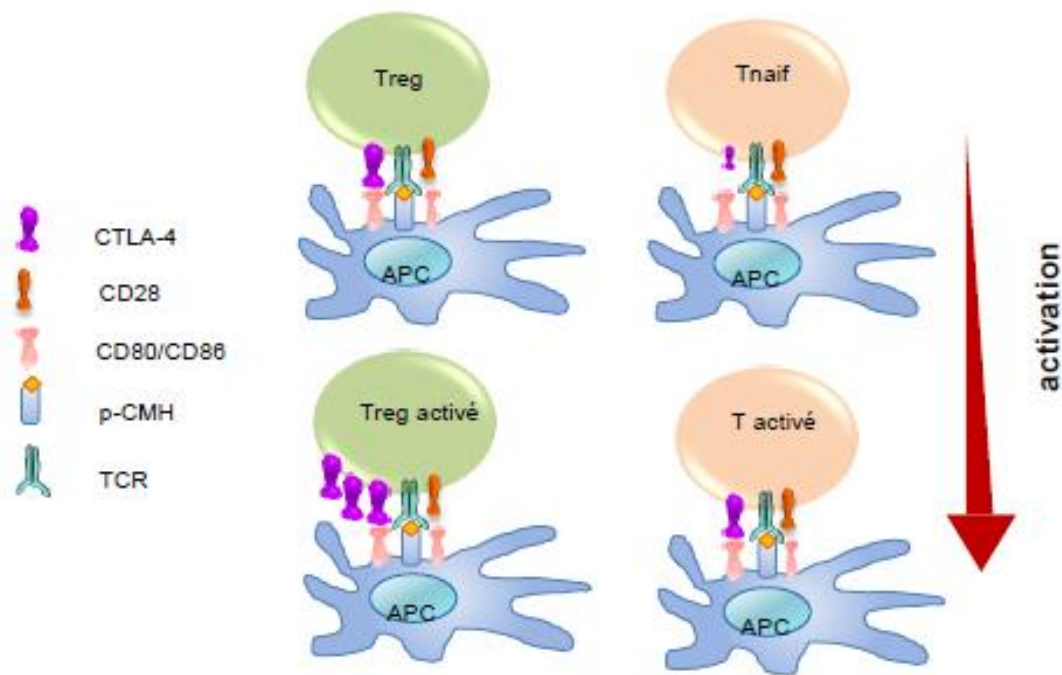


Figure 14. Comparaison de l'expression du CTLA-4 selon l'état d'activation des LT. Dans un contexte où les Treg et les LT ne sont pas activés : dans les LT naïfs, CTLA-4 étant très fortement recyclé, ces LT expriment très faiblement la molécule CTLA-4. Ainsi les LT naïfs vont pouvoir s'activer plus facilement via le CD28. Les Treg à l'état basal expriment CTLA-4, ce récepteur entre en contact avec les molécules de co-stimulation CD80/CD86 et permet le maintien des APC à l'état tolérogène. Dans ce cas, les Treg peuvent via le CTLA-4 inhiber l'activation des Tconv. Dans un contexte inflammatoire : les Treg et LT sont activés, son expression est augmentée sur les T activés.

déficit en Treg des souris CD28^{-/-} n'est pas uniquement dû à un défaut d'IL-2. Par exemple les souris IL-2^{-/-} présentent des précurseurs de Treg dans le thymus mais pas de Treg en périphérie; alors que dans les souris CD28^{-/-} il y a une absence presque totale de Treg à la fois au niveau central et périphérique (*Sansom and Walker, 2006*).

Le CD28 n'aurait pas un effet uniquement sur la présence ou la survie des Treg mais aussi sur leur prolifération. *In vitro*, les DC CD86⁺ matures issues de la moelle osseuse sont particulièrement efficaces pour induire la prolifération des Treg (*Yamazaki et al., 2003*). *In vivo*, le transfert adoptif de Treg à des souris déficientes pour CD80 et CD86 les rend incapables de proliférer (*Tang et al., 2003*). Inversement, l'injection d'un super agoniste de CD28, induisant probablement une augmentation du signal CD28, fait fortement proliférer les Treg (*Lin and Hunig, 2003*). D'ailleurs l'injection de cette molécule induit une rémission de l'EAE chez le rat, en augmentant la prolifération et la fonction suppressive des Treg (*Beyersdorf et al., 2005*). Enfin, le blocage de CD28 induit une déplétion préférentielle des Treg en division (*Takahashi et al., 2000*).

Qu'en est-il du rôle de CD28 dans la fonction suppressive des Treg ? Chez les souris CD28^{-/-}, les Treg résiduels sont capables de supprimer *in vitro* les Tconv aussi bien que les Treg WT (*Takahashi et al., 2000*). Toutefois les souris présentant un déficit en CD28 seulement dans les Treg (CD28^{fl/fl} x Foxp3^{yfp-cre}) ont un nombre normal de Treg à la périphérie mais développent une maladie auto-immune. Les auteurs suggèrent que cette auto-immunité est due à une diminution de la prolifération et de la capacité suppressive des Treg (*Zhang et al., 2013b*).

En résumé, le CD28 favoriserait la prolifération, la survie et la fonction suppressive.

2 : La voie du CTLA-4.

Le CTLA-4 est un membre de la famille de CD28 qui partage 30% d'homologie avec le CD28 et reconnaît les mêmes ligands, CD80 et CD86 (*Fife and Bluestone, 2008*). CTLA-4 est constitutivement exprimé sur les Treg alors que son expression est présente uniquement sur les Tconv activés (*Salomon et al., 2000; Takahashi et al., 2000*). Il existe une différence d'affinité entre le CD28 et le CTLA-4 pour leurs récepteurs (**Figure 14**). Des études de biophysique ont montré que le CTLA-4 a une affinité 20 à 100 fois supérieure au CD28 pour leurs ligands (*Collins et al., 2002*).

La création de souris déficientes pour le CTLA-4 a permis d'identifier le fonctionnement et le rôle de ce récepteur. Les souris CTLA-4^{-/-} développent une auto-immunité au bout de 3-4 semaines (*Tivol et al., 1995*). Cette auto-immunité est-elle due à l'absence de CTLA-4 dans les Treg ou les Tconv ? Comment définir clairement le rôle intrinsèque de CTLA-4 dans l'homéostasie ou la fonction des Treg ? La réponse à cette question reste controversée. En effet, E Shevach n'observe pas de diminution de la fonction suppressive des Treg en présence d'anticorps anti-CTLA-4 (*Thornton and Shevach, 1998*). De même, J Bluestone montre que les Treg issus des souris CTLA-4^{-/-} présentent la même capacité suppressive que les Treg WT (*Tang et al., 2004a*). En revanche, lorsque le CTLA-4 est spécifiquement muté dans les Treg, les résultats divergent. Des souris dans lesquelles seuls les Treg sont déficients en CTLA-4 (foxp3^{cre} x CTLA-4^{fl/fl}) présentent une auto-immunité létale comme chez les souris CTLA-4^{-/-}. Il a été démontré que cette auto-immunité était due à une altération de la fonction suppressive des Treg ne pouvant plus inhiber les DC matures (*Wing et al., 2008*). Ces données ont été confirmées par d'autres équipes. L Walker, dans un modèle de diabète, observe que le transfert de Treg CTLA-4^{-/-} ne suffit pas à réguler la maladie induite par les Tconv contrairement aux Treg sauvages (*Schmidt et al., 2009*). De façon notable, dans les souris foxp3^{cre} x CTLA-4^{fl/fl} la proportion de Treg est fortement augmentée, laissant supposer que le CTLA-4 régule la fonction suppressive des Treg mais aussi leur prolifération ou leur survie. D'autre part des études menées *in vitro* suggèrent que CTLA-4 participerait aussi à l'induction des iTreg (*Zeng et al., 2006*).

Pour conclure, on peut penser que l'absence de CTLA-4 ne modifie pas la fonction des Treg dans des tests *in vitro* car cette fonction ne met en évidence qu'une partie de l'arsenal suppresseur des Treg. Par contre, *in vivo*, le CTLA-4 joue un rôle majeur dans la capacité des Treg à contrôler une auto-immunité systémique.

3 : La voie ICOS/ICOS-L.

La molécule « Inductible Co-Stimulation » (ICOS) est un récepteur activateur de la famille CD28. Comme son nom l'indique, ICOS a la particularité d'être présent spécifiquement sur les LT CD4 et CD8 après activation (*Hutloff et al., 1999*), alors que 20% des Treg l'expriment à l'état basal (*Ito et al., 2008*). Le ligand d'ICOS, ICOS-L (B7h ou B7RP-1), est exprimé constitutivement par les LB et les macrophages (*Yoshinaga et al., 1999*).

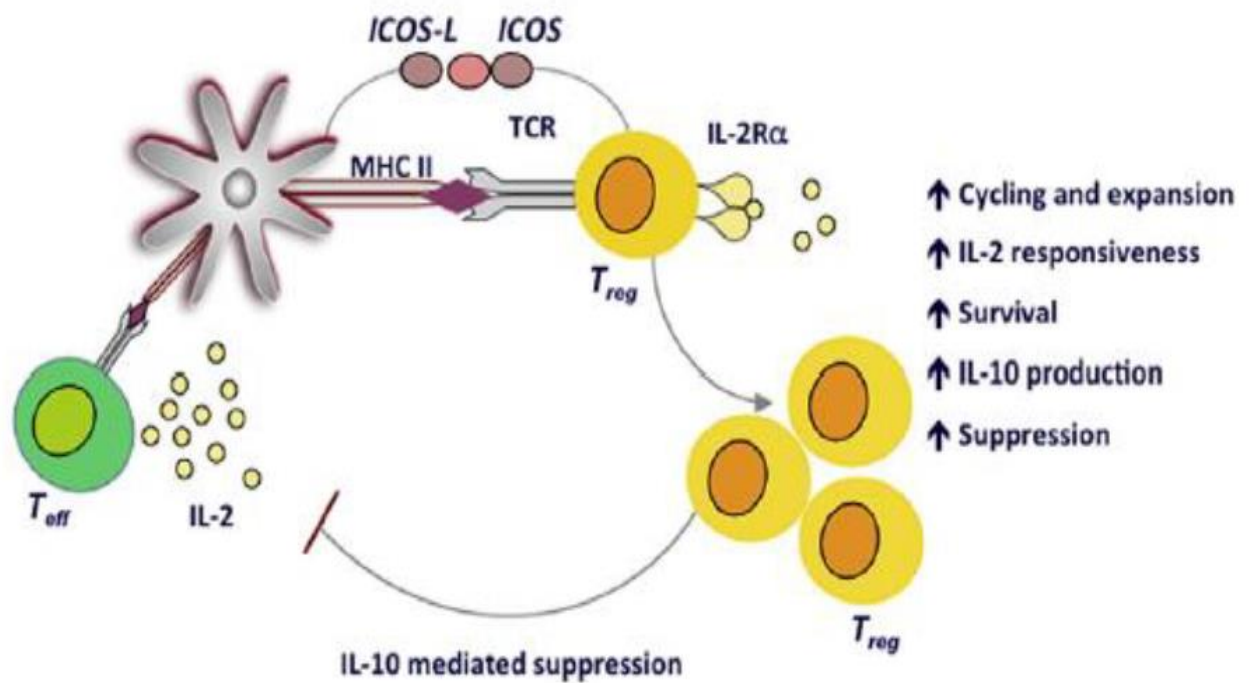


Figure 15. Le rôle positif de la voie ICOS/ICOS-L sur les Treg dans le DT1. Par l'interaction des Treg avec les DC via ICOS/ ICOS L, les Treg vont proliférer, être plus sensibles à l'IL-2, et produire plus fortement de l'IL-10. Ces Treg présentent aussi une capacité suppressive augmentée. Issu de (*Kornete and Piccirillo, 2011*).

Il semble que la voie ICOS/ ICOS-L ait différentes fonctions selon les cellules cibles (**Figure 15**). En effet l'activation de cette voie permet d'induire la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10. *Ex vivo*, une étude montre que les LT CD4⁺ ICOS^{low} sécrètent majoritairement l'IL-4, 5, 13 alors que les LT CD4⁺ ICOS^{high} produisent fortement de l'IL-10 (*Lohning et al., 2003*). De plus l'expression d'ICOS sur les Treg est positivement corrélée avec l'augmentation de l'expression de CD25. Ces données proposent que selon l'expression d'ICOS, les LT CD4 s'orienteraient vers un profil Th-2 ou Treg. D'autres études ont montré que la voie ICOS/ICOS-L favorise les Th-17 et surtout les Tfh en régulant l'expression de l'IL-17 et l'IL-21 (*Nurieva et al., 2008*). Ce rôle variable d'ICOS expliquerait la diversité des phénotypes observés chez les souris déficientes pour cette molécule de co-stimulation. Par exemple, les souris ICOS^{-/-} sont résistantes à l'induction de l'arthrite. Les souris présentent également une réduction du "swith" isotypique des anticorps et une diminution d'IL-17 (*Dong and Nurieva, 2003*). Inversement, dans un modèle de EAE l'absence d'ICOS entraîne une exacerbation de la maladie via une augmentation de l'IFN- γ (*Dong et al., 2001; Rottman et al., 2001*). Dans le diabète de type I, les souris NOD ICOS^{-/-} ou ICOS-L^{-/-} ne développent pas de maladie, montrant l'engagement précoce de cette voie dans l'activation des LT auto-réactifs (*Hawiger et al., 2008; Prevot et al., 2010*). Toutefois l'équipe de D Mathis et C Benoist a montré chez la souris NOD que les cellules du pancréas exprimant fortement ICOS et un TCR spécifique d'un antigène d'îlot (TCR-BDC2.5) sont régulatrices. De plus, un traitement avec un anticorps bloquant anti-ICOS-L induit un diabète chez ces souris adultes (*Herman et al., 2004*). Sur les Treg, une étude récente montre que la voie ICOS/ICOS-L favorise la prolifération et la fonction suppressive des Treg (*Kornete et al., 2012*). Une autre étude montre qu'ICOS joue un rôle critique dans la survie des Treg (*Chen et al., 2012*). Ces données sont en corrélation avec d'autres études menées *in vitro* montrant que les Treg ICOS^{-/-} suppriment moins les Tconv que les Treg WT (*Prevot et al., 2010*). Chez l'homme, les Treg ICOS^{high} infiltrant les tumeurs suppriment mieux les Tconv (*Strauss et al., 2008*). D'ailleurs l'expression d'ICOS serait en corrélation avec l'entrée en cycle des Treg (*Chen et al., 2012*). Cette voie présente donc un rôle pléiotrope en affectant à la fois les Tconv et les Treg. Dans le diabète l'inhibition de la voie ICOS/ICOS-L a un effet opposé sur la maladie. En effet une inhibition d'ICOS chez la souris NOD permet une prévention du DT1, alors que chez la souris BDC2.5 un déficit en ICOS induit une diminution des Treg et accélère le DT1 (*Prevot et al., 2010*).

Cette voie présente donc un rôle pléiotrope en affectant à la fois les Tconv et les Treg. Dans le diabète, la voie ICOS/ICOS-L affecte préférentiellement les T auto-réactifs ou les Treg selon l'avancement de la pathologie.

4 : La voie PD-1/PDL-1.

Le récepteur PD-1 fut décrit en premier comme une protéine surexprimée dans les hybridomes T, induisant leur mort (*Ishida et al., 1992*). PD-1 contient un domaine immunoglobuline, sous forme monomérique, avec une partie intracellulaire contenant des régions inhibitrices nommé « Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif » (ITIM) et « Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Inhibitory Motif » (ITSM) (*Fife and Bluestone, 2008*). PD-1 est exprimée transitoirement pendant la différenciation thymique par les thymocytes CD4⁺ CD8⁻ (*Nishimura et al., 1996*). A la périphérie, PD-1 peut être exprimée par différentes cellules comme les LT, LB ou NKT après activation (*Agata et al., 1996; Polanczyk et al., 2006*). De façon intéressante, l'activation du TCR, du BCR ou de la chaîne γ C par l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15 induit l'expression de PD-1 sur les LT (*Kinter et al., 2008*). Les ligands de PD-1, PDL-1 et PDL-2 sont des molécules de la famille de co-stimulation CD80/CD86. Ces deux récepteurs présentent des caractéristiques distinctes. Ils diffèrent par leur affinité puisque PDL-2 a trois fois plus d'affinité pour PD-1 que PDL-1. Ces deux récepteurs sont exprimés par les LB, DC et macrophages ; leur expression dépend du lieu environnant, par exemple plus il est enflammé plus l'expression de PDL-1 est augmentée. L'expression de PDL-1 est augmentée en cas d'inflammation.

La voie PD-1/PDL-1 régule l'activation lymphocytaire en inhibant le contact entre les T et les DC et participe au maintien de la tolérance (*Fife et al., 2009*). Les souris déficientes pour PD1 développent une maladie auto-immune ressemblant au lupus (*Nishimura et al., 2001*). Dans un modèle de diabète, le blocage de la voie PD-1 précipite l'apparition de la maladie (*Ansari et al., 2003*). De plus, dans le modèle d'EAE, l'inhibition de PDL-1 et PDL-2 par des anticorps neutralisants exacerbe la maladie (*Salama et al., 2003*).

En ce qui concerne le rôle de cette voie sur l'homéostasie des Treg, *in vitro* en présence d'anti-CD3 et d'anti-TGF- β l'engagement de la voie PD-1/PDL-1 favorise l'induction des iTreg chez la souris (*Francisco et al., 2009*). D'ailleurs, l'ajout de l'antagoniste PD1-Ig peut induire la surexpression de Foxp3 et augmenter la capacité suppressive des Treg.

	Modèle	Traitement		effet sur Treg		Références
		rTNF	anti-TNF	fonction suppressive	prolifération/expansion	
IN VITRO	homme sain	x		↘	n.d.	<i>Nagar et al., 2010</i>
	homme sain	x		↘	↘	<i>Valencia et al., 2006</i>
	homme sain	x		↘	n.d.	<i>Zanin-Zharov et al., 2010</i>
	Souris	x		↗	↗	<i>Chen et al. 2007; Chen et al., 2010</i>

IN VIVO	souris NOD	dès la naissance		↘	↘	<i>Hong Hua et al., 2004</i>
	souris NOD		dès la naissance	n.d.	↗	<i>Hong Hua et al., 2002; Cope et al., 1997</i>
	souris NOD	chez l'adulte		n.d.	↗	<i>Hong Hua et al., 2002</i>
	souris NOD		chez l'adulte	n.d.	↗	<i>Hong Hua et al., 2002</i>
	souris TNFR2 ^{-/-}			↘	↘	<i>Chen et al., 2013</i>
	souris TTg *		x	↗	↗	<i>Biton et al., 2011</i>
	souris TTg *	x		↗	(=)	<i>Biton et al., 2011</i>

rTNF= TNF recombinant

n.d. = non déterminé

Tableau 4. Récapitulatif non exhaustif de l'effet du TNF sur les Treg et les Tconv chez l'homme et la souris dans l'auto-immunité. (Inspiré du mémoire de thèse de Grinberg-Bleyer Yenkel 2010)

* : les souris TTg sont des souris transgéniques exprimant le TNF humain et présentent une arthrite à partir de 8-10 semaines de vie.

A l'inverse chez l'homme atteint d'infection chronique par le virus de l'hépatite C, la prolifération des Treg est augmentée en présence d'un anticorps bloquant anti-PDL-1 via une activation de STAT5 (*Franceschini et al., 2009*). Enfin, selon un modèle proposé par J Bluestone, il semble que l'engagement de la voie CTLA-4 s'effectuerait en premier et la voie PDL-1 plus tardivement (*Fife and Bluestone, 2008*). De plus l'action de PD-1 s'effectuerait plus sur des cellules présentes au sein du tissu même.

L'ensemble de ces données suggèrent que la voie PD-1/PDL-1 a un rôle crucial dans la tolérance. Cependant, cette voie a un rôle ambivalent sur l'homéostasie des Treg qui nécessite d'être clarifié.

E : La superfamille des récepteurs au TNF.

Les LT expriment différentes molécules de la superfamille des récepteurs au TNF. Ces molécules de co-stimulation ont des rôles différents selon les pathologies et les modèles étudiés. J'aborderai principalement leur effet sur les Treg périphériques.

1 : Le TNF- α et les Treg.

Le TNF- α est une cytokine au rôle pléiotrope, elle est un des participants majeurs dans l'initiation et l'orchestration de la réponse immune (*Aggarwal, 2003*). Le TNF- α est produit par les macrophages, les LT, les LB, les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses (*Sethi et al., 2008*). Fonctionnel sous sa forme trimérique, le TNF- α est initialement transmembranaire mais est souvent libéré dans le milieu extracellulaire après clivage par l'enzyme TACE (*Black et al., 1997*).

La fonction pro-inflammatoire du TNF- α est, dans certaines maladies auto-immunes comme la maladie de Crohn ou le psoriasis, indiscutable. Le TNF- α a pourtant deux facettes et ces dernières années plusieurs études ont montré qu'il peut être aussi anti-inflammatoire. En effet, l'injection de TNF- α peut avoir un effet bénéfique sur le lupus ou le diabète (*Jacob and McDevitt, 1988; Yang et al., 1994*), (**Tableau 4**). Ainsi, dans le cas du diabète de la souris NOD, l'équipe de Mc Devitt a observé que, selon l'avancement de la maladie, le TNF- α peut avoir un effet favorable ou délétère. Ils observent que l'injection de TNF- α pendant 3 semaines à des souris NOD nouveau-nées précipite la maladie. A l'inverse, ce même traitement administré à des souris NOD âgées réduit l'incidence du diabète. L'équipe d'Oppenheim a montré *in vitro*, le rôle activateur du TNF- α sur les Treg. En effectuant des

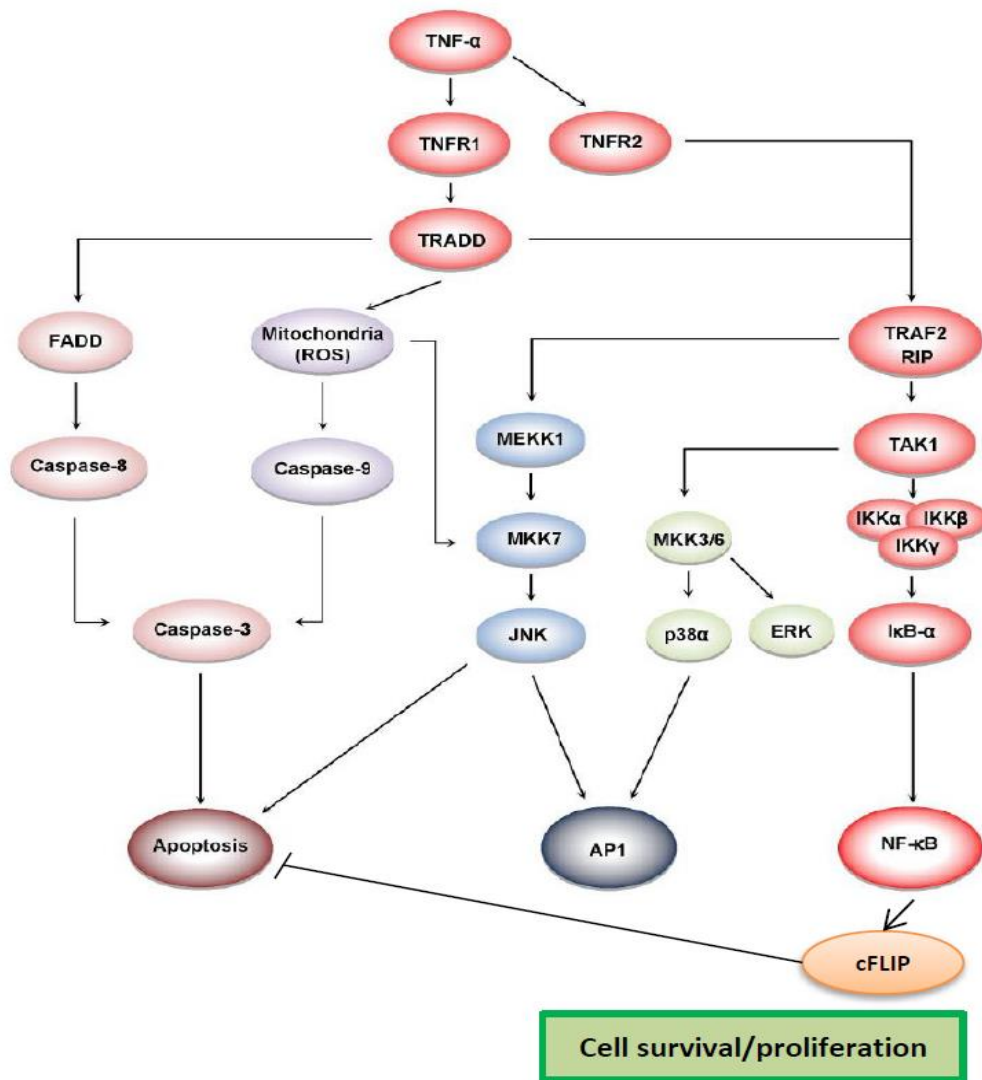


Figure 16. Voie de signalisation du TNFR-1 et TNFR-2. Le TNF- α va se fixer sur le TNFR-1 ou le TNFR-2. L'engagement de la voie activée par le TNFR-1 est la voie canonique, celle-ci passe par différentes caspases et conduit à l'apoptose de la cellule. L'engagement du TNFR-2 active la voie dite alterne, celle-ci active NF- κ B et AP-1 et induirait la prolifération ou la survie de la cellule. Adapté de (Aggarwal *et al.*, 2012; Faustman and Davis, 2010).

expériences de co-culture de Treg et de Tconv, il montre qu'une exposition prolongée au TNF- α augmente la capacité suppressive des Treg (*Chen et al., 2007*). Des résultats opposés ont été obtenus chez l'homme (*Zanin-Zhorov et al., 2010*). D'autre part, les Treg issus de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ont une fonction suppressive réduite. Le traitement de ces patients par l'infliximab (anti-TNF bloquant) restaure la capacité suppressive des Treg (*Ehrenstein et al., 2004*). Ces travaux montrent le rôle ambivalent du TNF- α sur la fonction suppressive des Treg. Toutefois le TNF- α présenterait un effet synergique avec l'IL-2 pour favoriser l'expansion des Treg. La mise en culture de LT CD4⁺ avec de l'IL-2 et du TNF- α induit une forte augmentation des Treg, d'un facteur 4 après 72h de mise en culture (*Chen et al., 2007*).

Le TNF- α se fixe sur deux récepteurs : le TNFR-1 (p55) et le TNFR-2 (p75). Les cellules vont réagir différemment au TNF- α selon qu'il se fixe au TNFR-1 ou au TNFR-2. Le TNFR-1 exprimé par la plupart des cellules, possède un domaine de mort dans sa région intracellulaire. Il fut décrit que le TNFR-1 induit la mort des cellules par apoptose via un signal caspase 3 (*Aggarwal, 2003*). De plus, le signal induit par le TNFR-1 entraîne une forte activation de NF- κ B. Celle-ci peut conduire à une expression de cytokines inflammatoires et au caractère pro-inflammatoire du TNF- α . L'expression du TNFR-2 est restreinte aux LT. Le TNFR-2 n'ayant pas de domaine de mort, il induirait plutôt l'activation et la prolifération des LT via le signal NF- κ B et AP-1 (*Faustman and Davis, 2010*) (**Figure 16**). Le TNF- α aurait donc un effet positif sur les Treg via le TNFR-2. A l'état basal 30% des Treg expriment le TNFR-2 et cette expression est augmentée sur les Treg activés (*Chen et al., 2010a*). L'expression du TNFR-2 favorise la capacité suppressive et la prolifération des Treg. Les Treg exprimant le TNFR-2 infiltrant les tumeurs suppriment mieux que leurs homologues n'exprimant pas le TNFR-2 (*Chen et al., 2008*). De plus, chez les souris TNFR2^{-/-}, celles-ci présentent une proportion de Treg réduite à la fois dans le thymus et en périphérique (*Chen et al., 2013; Housley et al., 2011*). Enfin, dans un contexte d' " Induced bowel Diseases " (IBD), le transfert de Treg TNFR-2^{-/-} ne permet pas de prévenir la maladie contrairement aux Treg WT. Ceci suggère donc que le TNF- α via l'expression du TNFR-2 est important pour la fonction et la stabilité des Treg (*Chen et al., 2013*). Cependant, cet effet du TNF- α favorable à la fonction suppressive des Treg reste débattu. Il pourrait y avoir une différence entre l'homme et la souris (**Tableau 4**).

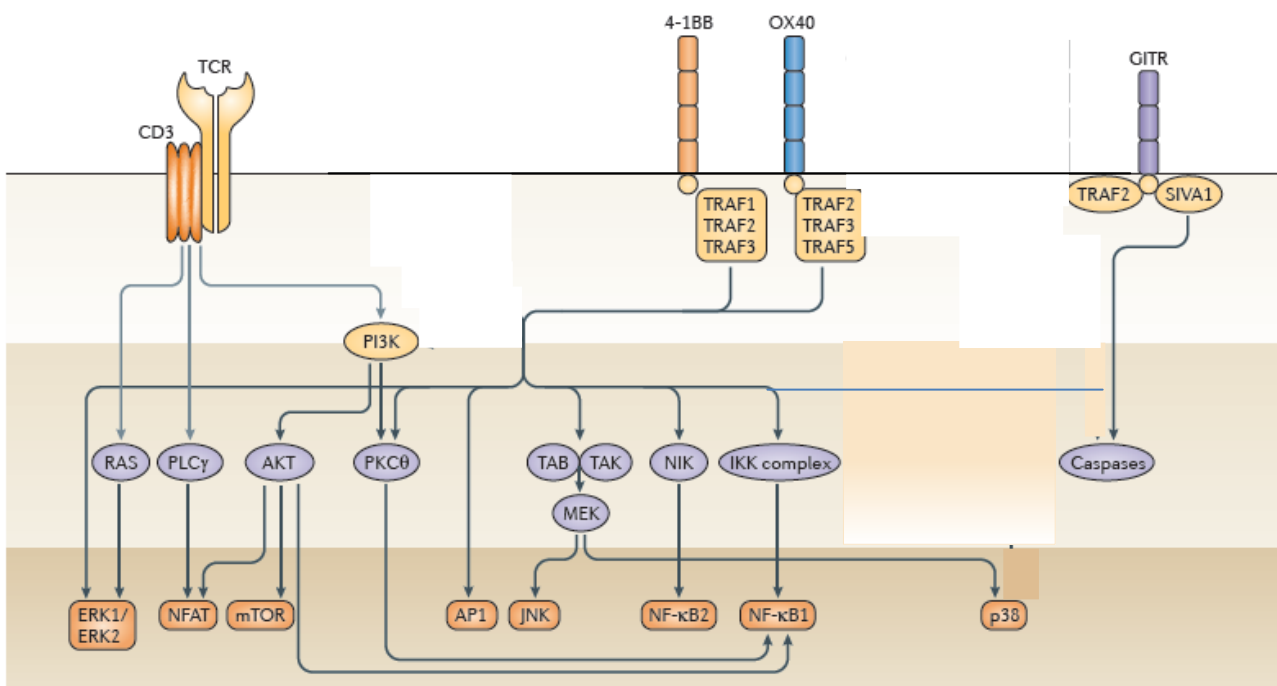


Figure 17. Récepteurs et voies de signalisation activés par les TNFRSF dans LT. La super famille des TNFR est en association avec les TRAF (TNF receptor-associated Factor). Sous le signal TCR-CD3 il y a une activation des LT et une induction de la prolifération. TRAF2 associé aux OX40, 4-1BB et GITR active les voies JNK (c-Jun N terminal Kinase) et NF-κB. Adapté de (*Chen and Flies, 2013*).

2 : OX40.

OX40 (CD134 ou TNFRSF4) est un membre de la super famille des récepteurs au TNF. Sous l'induction d'OX40, les voies PI3K, AKT et du NF- κ B sont activées (**Figure 17**). OX40 est principalement présent sur les LT activés (*Watts, 2005*) et constitutivement sur les Treg (*Fontenot et al., 2005c*). Le ligand d'OX40, OX40-L est exprimé par l'ensemble des CPA. Des expériences dans des modèles de colite ou d'EAE ont montré que l'engagement de la voie OX40/OX40-L a un effet stimulateur des Tconv (*Malmstrom et al., 2001*). Par exemple, les souris OX40^{-/-} ont une EAE de sévérité réduite accompagnée d'une forte diminution des Tconv IFN- γ ⁺ infiltrant le CNS (*Carboni et al., 2003*).

Le rôle de cette voie dans l'homéostasie des Treg reste pourtant moins évident. En effet les souris OX40^{-/-} présentent un nombre de Treg faiblement réduit dans le thymus au début de leur vie mais ce déficit est très vite compensé après une semaine (*Takeda et al., 2004; Vu et al., 2007*). Ces travaux montrent que la voie OX40 influence peu ou pas le développement des Treg. A la périphérie, ces souris présentent aussi une très faible diminution des Treg (*Griseri et al., 2010*). On aurait pu suggérer qu'OX40 favorise l'induction d'iTreg mais il semble qu'OX40 ait plutôt un effet inhibiteur sur cette induction. *In vitro*, plusieurs travaux ont montré qu'OX40 inhibe la conversion des Tconv en Treg induits par le TGF- β (*So and Croft, 2007*), ou par l'IL-10 (*Ito et al., 2006*). En revanche, une étude montre que la voie OX40 est nécessaire pour limiter l'apoptose des Treg après activation *in vivo* (*Xiao et al., 2012*). OX40 permettrait aussi leur prolifération et une meilleure fonction suppressive (*Griseri et al., 2010*). Ce dernier effet d'OX40 sur les Treg a été infirmé par d'autres études. Par exemple à l'état basal l'administration d'un anticorps agoniste de la voie OX40 réduit la fonction suppressive des Treg (*Vu et al., 2007*). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que, suite à l'engagement d'OX40, les Treg prolifèrent fortement mais perdent l'expression de Foxp3, diminuant ainsi leur fonction suppressive. Cette perte de Foxp3 est compensée par l'ajout d'IL-2 exogène (*Xiao et al., 2012*).

Comme nous le voyons ici, le rôle d'OX40 sur les Treg reste débattu. Néanmoins, il est probable que dans une situation fortement inflammatoire avec une forte expression d'IL-2 et d'OX40-L, OX40 participe à l'activation des Treg.

3 : GITR.

Le GITR est exprimé par de nombreuses cellules du système immunitaire, dont les LT activés, mais son expression est constitutive dans les Treg. Le ligand de GITR (GITR-L) est lui exprimé par les APC et les LT activés. Le GITR agit comme une molécule de co-stimulation sur les Tconv et son activation augmente la réponse anti-tumorale ou antivirale (*Cohen et al., 2010; Cuzzocrea et al., 2006*). De même dans le diabète, l'activation de la voie GITR accélère l'apparition de la maladie, probablement en stimulant la prolifération des Tconv (*You et al., 2009*). Ce rôle co-stimulateur semble être toutefois secondaire en comparaison avec le CD28 (*Mahesh et al., 2006*). Ces données montrent bien que le GITR favorise l'activation des Tconv. Qu'en est-il pour les Treg ? Pourquoi donc les Treg expriment-ils alors fortement ce récepteur ?

Le rôle de GITR sur l'homéostasie des Treg est lui aussi controversé. Des études ont montré que l'engagement du GITR peut inhiber la fonction suppressive des Treg ou rendre les Tconv réfractaires à la suppression. En effet, l'analyse du transcriptôme de Treg prétraités avec un anticorps anti-GITR bloquant montre une diminution des transcrits de gènes impliqués dans la suppression (*Gondek et al., 2005*). *In vitro*, la présence d'un anticorps agoniste anti-GITR inhibe la capacité suppressive des Treg (*Shimizu et al., 2002*). Plus tard, les travaux d'E Shevach montrent que cette inhibition de la fonction suppressive des Treg n'est pas due à un défaut de ces cellules mais plutôt à une résistance des Tconv à la suppression par les Treg. En effet dans des expériences de co-culture des Treg et Tconv WT ou ICOS^{-/-}, l'effet neutralisant n'est obtenu que si les Tconv sont WT. L'expression ou non du GITR sur les Treg n'a pas d'incidence sur la suppression (*Stephens et al., 2004*). Ces observations ont été confirmées dans d'autres modèles. L'activation de GITR favorise la production de cytokines inflammatoires par les Tconv, ce qui bloquerait la suppression exercée par les Treg (*Mahesh et al., 2006*).

En revanche, d'autres travaux laissent supposer que le GITR aurait un rôle positif sur l'homéostasie des Treg. De façon notable, les souris GITR^{-/-} présentent une réduction de 15 à 30 % des Treg à la périphérie par rapport aux souris sauvages (*Stephens et al., 2004*). De plus, l'administration d'une molécule agoniste de GITR (GITR-L-Fc) induit préférentiellement la prolifération des Treg. De plus, une étude a montré que suite à l'interaction des Treg avec les DC via le GITR-L, les DC vont produire moins d'IL-12, régulant ainsi la prolifération des

Tconv. Enfin, dans un modèle de souris transgéniques, l'expression constitutive de GITR-L sur les APC favorise l'induction de Treg Foxp3⁻ IL-10⁺ (*Carrier et al., 2012*).

En résumé, il semble que le GITR possède une certaine dualité dans l'homéostasie des LT. Comme beaucoup de molécules de co-stimulation, il peut avoir un rôle immuno-stimulateur en favorisant l'activation des Tconv, mais aussi immuno-modulateur en favorisant l'induction des iTreg et la prolifération des Treg.

4 : 4-1BB.

4-1BB (CD137 ou TNFRS 9) (**Figure 17**) est une molécule exprimée par tous les Tconv après activation. Toutefois à l'état basal la très grande majorité des LT 4-1BB⁺ sont des Treg (*Sugimoto et al., 2006*). Comme le GITR, 4-1BB a un rôle co-stimulateur pour les Tconv (*Watts, 2005*). L'activation de cette voie inhibe la fonction suppressive des Treg ou bien, comme le GITR, rend les Tconv réfractaires à la suppression. En effet, *in vitro*, une étude a montré que l'activation de 4-1BB bloque la capacité suppressive des Treg (*Choi et al., 2004*). D'autres études ont montré que le signal induit par 4-1BB favorise plutôt la résistance des Tconv à être supprimés plutôt que la fonction suppressive des Treg elle-même (*Elpek et al., 2007*). De façon notable, à l'état basal, les souris déficientes pour 4-1BB ne présentent pas de déficit en Treg (*Maerten et al., 2006*).

Pourtant, l'injection d'un agoniste de 4-1BB inhibe le développement de certaines pathologies auto-immunes comme l'EAE (*Sun et al., 2002*) ou le diabète (*Irie et al., 2007*).

L'ensemble de ces données indique que 4-1BB aurait un rôle dans l'homéostasie des Treg, principalement dans des conditions inflammatoires.

5 : DR5.

DR5 est un membre de la famille des TNFR qui a pour ligand le "TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand" (TRAIL). TRAIL présente différents rôles dont l'induction de l'apoptose, mais il participe aussi à la prévention de l'auto-immunité. Les souris déficientes en TRAIL présentent un syndrome auto-immun causé en partie par une perturbation de la sélection négative (*Lamhamedi-Cherradi et al., 2003b*). Le rôle de TRAIL est aussi associé à d'autres maladies auto-immunes comme le diabète, ou l'EAE. Par exemple l'administration

d'un antagoniste de TRAIL à des souris NOD augmente l'incidence du diabète (*Lamhamedi-Cherradi et al., 2003a*). Dans l'EAE, l'inhibition de TRAIL par injection de son récepteur DR5 soluble exacerbe la maladie (*Hilliard et al., 2001*). En complément d'un effet direct sur les Tconv, TRAIL pourrait aussi favoriser la régulation des Treg. Une étude a rapporté que l'expression de TRAIL sur les DC présentant le peptide « Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein » (MOG) permet de prévenir l'EAE avec une expansion de Treg spécifiques. De plus, l'injection de TRAIL recombinante induit une augmentation des Treg dans la rate (*Wang et al., 2009*).

Bien que l'effet de TRAIL sur les Treg nécessite d'être plus amplement étudié, il semble que ce récepteur favorise leur expansion.

F : Une autre cytokine pro-inflammatoire : l'IL-1.

L'IL-1 est une cytokine pro-inflammatoire produite par différents types cellulaires (*O'Sullivan et al., 2006*). Ses propriétés pro-inflammatoires sont bien connues, injectée à de très faibles quantités elle provoque de la fièvre et des érythèmes (*Dinarelli, 1996*). L'IL-1 induit d'une part des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-6, d'autre part elle permet la prolifération des Tconv et augmente leur résistance à la suppression médiée par les Treg (*O'Sullivan et al., 2006*). D'ailleurs un déficit en IL-1 Ra qui est un antagoniste naturel de l'IL-1 entraîne de sévères pathologies inflammatoires (*Horai et al., 2000*). Actuellement, l'IL-1Ra est utilisé dans de nombreux essais cliniques comme l'arthrite rhumatoïde pour limiter l'inflammation (*Niu et al., 2011*). Les récepteurs de l'IL-1, CD121a et CD121b, sont exprimés par les Treg à l'état basal (*Tran et al., 2009a*). Ceci suggère que l'IL-1 influence l'homéostasie des Treg. D'ailleurs *in vitro*, il a été démontré que les Treg stimulés par l'IL-1 induisent une augmentation de leur prolifération (*Brinster and Shevach, 2008*).

G : Les signaux intracellulaires dans l'homéostasie des Treg.

1 : La voie PI3K, Akt/mTOR.

Nous avons vu précédemment que la signalisation déclenchée par l'IL-2, le CD28, voire même les membres de la famille TNFR active différentes voies de signalisation dans les LT, notamment la voie PI3K/Akt/mTOR. Celle-ci a un effet délétère sur la différenciation des

Treg, aussi bien des Treg thymiques que des Treg induits à la périphérie (*Haxhinasto et al., 2008*). En effet *in vitro*, en présence de Tconv stimulés, l'inhibition de la voie PI3K/mTOR induit l'expression de Foxp3 après 18h seulement de culture (*Sauer et al., 2008*). *In vivo*, les souris déficientes pour un activateur de la voie Akt mTORC-2 ont une augmentation de l'induction des Treg (*Delgoffe et al., 2009*). Deux études récentes ont mis en relation la voie PI3K/Akt/mTOR avec la régulation directe de Foxp3. En effet, les facteurs FOXO1 et 3, favorisent l'expression de Foxp3 en se fixant sur son promoteur et sa région CNS2. Ces facteurs sont séquestrés dans le cytoplasme en cas d'activation d'Akt (*Harada et al., 2010; Kerdiles et al., 2010*). Le maintien de l'expression de Foxp3, pourrait être relié au fait que les Treg surexprimés un inhibiteur de cette voie, la « Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome TEN » (PTEN) (*Walsh et al., 2006; Zeiser et al., 2008*).

2 : Les miRNA et les Treg.

Les miRNA (microRNA ou mirR) sont des petits RNA simple brin non traduits. Ils régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel principalement en favorisant la dégradation des ARN messagers. L'équipe de J Cobb a été la première à avoir identifié l'expression des miRNA dans les Treg (*Cobb et al., 2006*). Plusieurs études suggèrent que ces miRNA jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'expression des gènes induits par Foxp3 et influenceraient la fonction et l'homéostasie des Treg (*Zhou et al., 2008*). Les miRNA sont contrôlés par deux RNases de type III : Dicer et Drosha. Une mutation de ces deux enzymes dans les Treg déclenche un syndrome auto-immun (*Chong et al., 2008; Liston et al., 2008a*). Cette auto-immunité pourrait s'expliquer par le fait que la capacité suppressive des Treg Dicer^{-/-} est réduite à l'état basal et inexistante dans des conditions inflammatoires. Certains miRNA ciblent particulièrement la fonction suppressive comme le miR-142-3p ou le mir-146a. Par exemple, la présence de miR-142-3p dans les Treg provoque une diminution des cAMP, acteurs de la suppression (*Huang et al., 2009*). De même, il a été montré que l'expression de miR-146a est indispensable à la fonction suppressive des Treg *in vivo*.

De plus, miR-146a bloque l'activation excessive de STAT-1 dans les Treg. Cette inhibition permet le contrôle de la production d'INF- γ par les Treg et préviendrait ainsi la conversion des Treg en Th-1 (*Lu et al., 2010*). Les miRNA favorisent aussi la prolifération des Treg (*Liston et al., 2008a*). Par exemple l'expression de mir-155 régule la survie et la prolifération des Treg en ciblant SOCS1, qui est un inhibiteur du signal IL-2 (*Lu et al., 2009*).

Il semble qu'au sein des Treg, le facteur Foxp3, en régulant l'expression des miRNA puisse influencer sa fonction suppressive et sa prolifération.

Troisième partie : Le diabète de type I.

Avant-propos.

L'étymologie du mot diabète, du grec *diabainen* signifie " qui passe au travers ". Le terme diabète regroupe plusieurs types de maladies métaboliques hétérogènes pouvant conduire à une augmentation du taux de sucre dans le sang et les urines et une polyurie associée à une soif excessive. Ces maladies sont associées à de nombreuses complications comme des rétinopathies, néphropathies, neuropathies et des troubles cardiovasculaires. On distingue différents types de diabète :

-Le diabète de type 2 (DT2), appelé aussi diabète insulino-résistant, s'observe souvent chez des individus en surpoids ou chez les personnes âgées. Ce diabète est caractérisé par une résistance à l'insuline par les cellules cibles constituant l'organisme. Les cellules productrices d'insuline, les cellules β , vont produire de l'insuline en grande quantité jusqu'à l'épuisement, entraînant à terme une insulino-thérapie. Cette forme représente près de 80% des cas de diabète.

-Le diabète gestationnel, semblable au DT2, touche les femmes enceintes à partir de 22 semaines d'aménorrhée. Ce diabète serait causé par la production d'hormones placentaires. Cette forme de diabète requiert une normalisation de la glycémie stricte via une diététique adaptée et/ou éventuellement un traitement transitoire par insuline.

-Les diabètes nommés "Maturity Onset type Diabetes of the Young" (MODY) sont des formes rares de maladies génétiques mono géniques autosomales. On connaît 11 types de diabète MODY.

-Le diabète de type 3, ou diabète cétonurique, est caractérisé par deux étapes : une première phase aiguë associée à une hyperglycémie sévère entraînant une cétose ou une acidocétose. Une seconde phase de diabète contrôlable ponctuée de quelques récidives de cétose.

-Le diabète de type 1 (DT1) ou diabète auto-immun, touche principalement les enfants ou les jeunes adultes. Il est caractérisé par une attaque auto-immune des cellules β entraînant une insulino-pénie. Dans la suite de cet exposé je ne parlerai que de ce type de diabète.

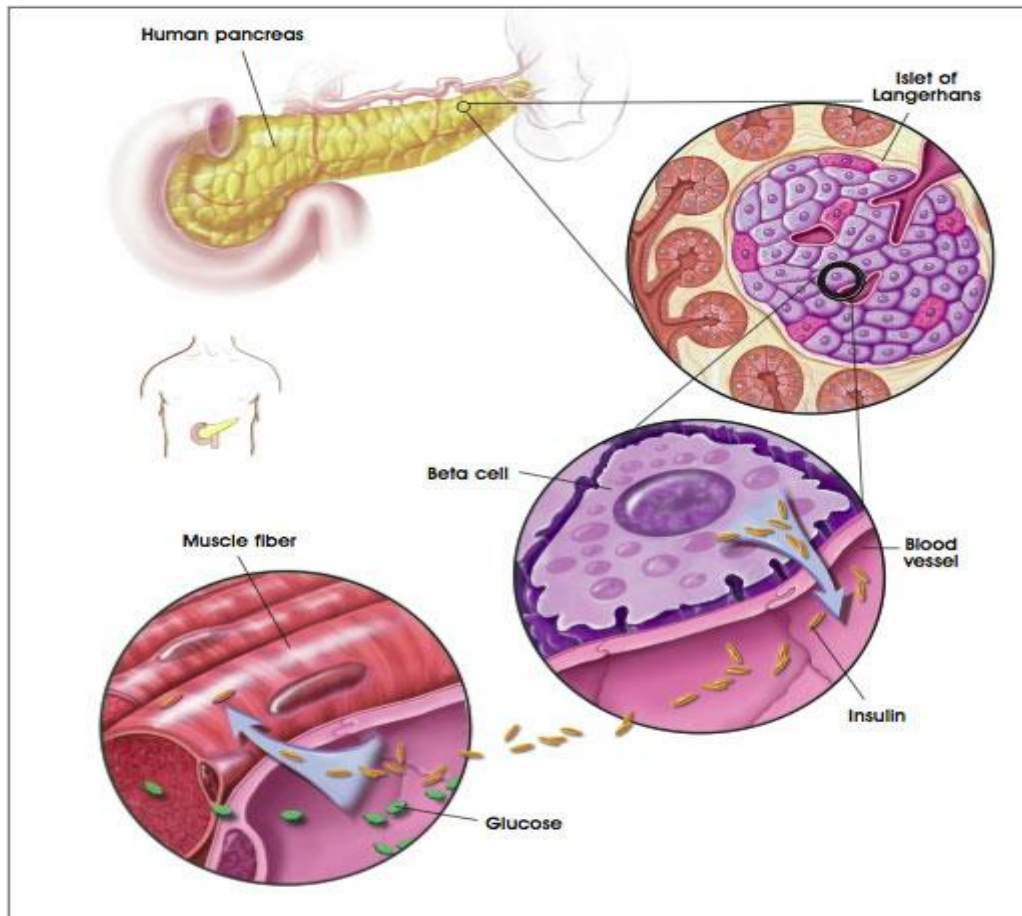


Figure 18. Structure du pancréas et production d'insuline chez l'homme. Le pancréas est constitué de différents types cellulaires dont les cellules β situées au niveau des îlots de Langerhans. Ces cellules produisent de l'insuline distribuée dans le sang et permettent l'assimilation du glucose au niveau tissulaire. Issu de (*EuroStem Cell .org 2001*)

I : La physiopathologie du diabète.

A : Le pancréas et le DT1.

1 : Le pancréas.

Le pancréas est un organe complexe constitué de 2 types de tissus différents : le tissu exocrine, qui synthétise puis sécrète dans le duodénum des enzymes de la digestion, et le tissu endocrine, qui synthétise puis sécrète dans le sang des hormones dont celles de la régulation du métabolisme du glucose. Le tissu endocrine est constitué de différents types cellulaires : les cellules α sécrétant le glucagon, les cellules δ la somatostatine, les cellules ε la ghreline, les cellules PP le polypeptide pancréatique et les cellules β l'insuline. Toutes ces cellules sont regroupées en une seule microstructure appelée îlot de Langerhans ou îlot pancréatique (**Figure 18**). Dans le cas du DT1, la maladie est causée par une destruction des cellules β ce qui entraîne une insulino-pénie.

2 : Le DT1 ; une maladie auto-immune.

On distingue deux types de maladies auto-immunes : (i) celles dites “systémiques” qui ciblent plusieurs tissus ou organes, impliquant des lymphocytes spécifiques d'auto-antigènes ubiquitaires (par exemple, le lupus) ; (ii) celles dites “spécifiques d'organe”, pour lesquelles les lymphocytes auto-réactifs pathogènes ciblent un ou plusieurs antigène(s) exprimé(s) par un organe précis comme le pancréas dans le cas du diabète de type I (DT1) ou le système nerveux central dans le cas de la sclérose en plaques. Le DT1 ou diabète insulino-dépendant est un exemple de maladie auto-immune par excellence. Comme la majorité des maladies auto-immunes, le DT1 se manifeste pendant l'enfance ou chez les jeunes adultes. En 2009, la prévalence du DT1 en France atteint près de 160 000 personnes (valeur issue de l'association des diabétiques de France) et ce nombre est en augmentation de 3,7 % par an (valeur issue de l'institut de veille sanitaire, inVS).

Les principaux signes cliniques du DT1 sont avant tout l'hyperglycémie et la présence de sucre dans les urines (glycosurie). Ils sont causés par une production insuffisante d'insuline ne permettant pas aux cellules de l'organisme d'assimiler correctement le glucose. On estime que ces signes apparaissent lorsque plus de 70-80 % de la masse de cellules β ne produisent plus d'insuline. Un grand nombre de complications sont associées à cette maladie. En effet,

une hyperglycémie prolongée peut provoquer : (i) des atteintes cardiovasculaires (infarctus, athérosclérose et accident vasculaire cérébral (AVC)), (ii) une micro-angiopathie rétinienne (rétinopathie diabétique) pouvant mener à une cécité, (iii) une perte de la sensibilité des extrémités des membres, (iv) une insuffisance rénale chronique...

B : Un modèle murin de DT1 spontané, la souris NOD.

En 1980 fut découverte la souris NOD qui développe de façon spontanée un diabète auto-immun. La physiopathologie de la maladie présente une grande homologie avec la pathologie humaine. D'ailleurs le polymorphisme de certains gènes susceptibles au développement du DT1 sont associés chez les patients et chez la souris NOD (CMH, IL-2).

Le diabète chez ces souris apparaît à partir de 12 semaines et atteint jusqu'à 80% chez les femelles et seulement 20% chez les mâles avec des variations en fonction de l'état sanitaire des animaleries. Cette différence suggère que les hormones sexuelles peuvent avoir un rôle dans le développement de la maladie ou dans l'intensité de l'auto-immunité. De façon notable, cette divergence sexuelle n'est pas observée chez l'homme (*Delovitch and Singh, 1997*).

On reconnaît dans l'histoire naturelle de la maladie chez la souris NOD deux "check-points". Le premier s'initie vers la deuxième semaine d'âge avec la mort physiologique des cellules β (*Turley et al., 2003*). Des antigènes d'îlots vont être relargués, capturés et apprêtés par les CPA dans les ganglions drainant le pancréas. Au sein des ganglions des LT auto-réactifs vont s'activer face à ces auto-antigènes. Ce phénomène correspond au début de l'initiation de l'infiltration pancréatique (*Melli et al., 2009*). D'ailleurs une ablation des ganglions pancréatiques de souris âgées de trois semaines permet la prévention du diabète, montrant l'importance des ganglions pancréatiques dans l'initiation de la maladie (*Gagnerault et al., 2002*). Toutefois, d'autres études ont montré que l'activation de LT CD8⁺ se ferait directement dans le pancréas (*Wang et al., 2010b*). Les lymphocytes infiltrant sont probablement enrichis en cellules spécifiques d'antigènes d'îlots, tels que l'insuline ou IA-2 (*Wen et al., 1998*). Pendant cette période de plusieurs semaines, l'insulite progresse et se répartit dans la majorité des îlots pancréatiques. Celle-ci est contrôlée par différents mécanismes de tolérance et ne conduit pas toujours à la maladie chez la NOD.

Le deuxième “check-point” apparaît lorsque la masse de cellules β fonctionnelles est inférieure à 20%, les signes cliniques apparaissent. Dans ce cas, l’insulite devient pathogène. De façon notable, l’environnement inflammatoire perturberait la production d’insuline par les cellules β sans les tuer pour autant. D’ailleurs, à ce stade il est possible d’observer une rémission du diabète si l’inflammation est stoppée (**voir article 3**). De plus il semblerait que de nouvelles cellules β puissent se différencier à partir de précurseurs présents dans le pancréas (*Xu et al., 2008*). En effet, il a été retrouvé chez la souris adulte des progéniteurs exprimant la neurogénine 3 qui présentent la capacité à se différencier en cellules β pancréatiques. D’autres études ont observé une capacité proliférative des cellules β en réponse à l’inflammation chez la souris NOD (*Dor et al., 2004*).

Notons que chez l’homme aussi lors de l’apparition des premiers signes cliniques, 60 à 90% des cellules β sont détruites ou non fonctionnelles. Ces cellules β restantes sont importantes car elles peuvent permettre une rémission transitoire chez 60% des patients après le début du traitement à l’insuline. Cette phase est appelée “Honey Moon” lune de miel. Les mécanismes mis en jeu dans l’amélioration du fonctionnement des cellules β sont encore mal connus, mais il semblerait qu’un stimulus continu épuise ces cellules. Ainsi, l’apport exogène en insuline permettrait une amélioration fonctionnelle des cellules β . Ce point de rupture offre une courte fenêtre thérapeutique pendant laquelle les îlots résiduels ont la capacité de produire une quantité suffisante d’insuline pour rétablir la glycémie (*Chatenoud and Bluestone, 2007*).

C : Les facteurs immunologiques responsables du DT1.

1 : Les facteurs génétiques du DT1.

De nombreuses études montrent l’implication de facteurs génétiques dans le développement du DT1. Par exemple chez l’homme, si un sur deux jumeaux homozygotes est atteint de DT1, son frère a un risque de 50% de développer la maladie (*Concannon et al., 2009*). Ces dernières années, plusieurs études d’analyse du génome de diverses cohortes de sujets sains et malades ont permis d’identifier de nombreux gènes potentiellement impliqués dans la maladie. On dénombre aujourd’hui jusqu’à 50 loci IDD (Insuline Dependent Diabetes) (*Polychronakos and Li, 2011*) qui confèrent une susceptibilité au DT1. Parmi ces loci, de nombreux gènes de l’immunité ont été identifiés (**Figure 19**).

1a : Les facteurs génétiques associés aux gènes du CMH.

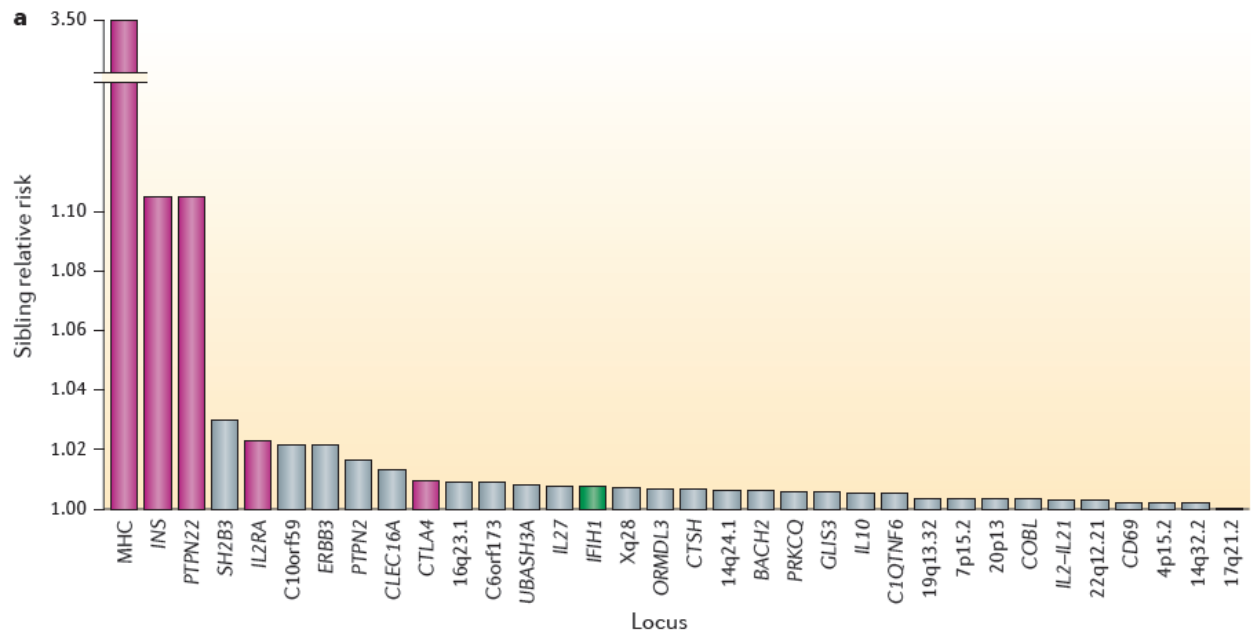


Figure 19. Représentation des différents loci génétiques jouant potentiellement un rôle dans le DT1. Représentation des différents gènes de susceptibilités au DT1 tels que les locus du CMH, de l'insuline, du récepteur à l'IL-2 et autres. Issu de (*Polychronakos and Li, 2011*).

En 1974 une première région génique du CMH nommée IDDM1 (Insulin Dependant Diabetes Mellitus 1), située sur le chromosome 6p21 a été identifiée chez l'homme (*Nerup et al., 1974*). Plus tard, des études ont précisé que certains allèles du gène du CMH-II confèrent une prédisposition au DT1 (*Aly et al., 2006; Undlien et al., 1997*). Le locus du CMH contribue approximativement à 40% de la susceptibilité au DT1, il représente le gène majeur de sensibilité à cette maladie. Certains de ces différents allèles codent pour des résidus d'acides aminés : sérine, alanine ou valine de la position 57 du DQ β du CMH II. Cette variation peptidique peut diminuer l'affinité d'interaction entre le p-CMH II et le TCR ou peut former un complexe p-CMH instable (c'est le cas pour l'haplotype HLA DQ8), ce qui pourrait altérer la sélection négative dans le thymus. Par exemple chez l'homme, l'analyse de la répartition allélique a montré que 30 à 50% des patients atteints de DT1 présentent un haplotype hétérozygote DR3/4-DQ2/8. La corrélation entre l'haplotype du CMH-II et le DT1 fut confirmée chez la souris NOD exprimant un de ces allèles humains (*Wen et al., 2000*). De façon notable, à l'état basal la souris NOD possède une molécule de CMH-II IA^{g7} très similaire au CMH-II humain HLA DQ8 (*Suri et al., 2005*). Enfin, il existe aussi des formes alléliques des gènes du CMH-II qui confèrent plutôt une protection du DT1. Parmi les loci DRB1, DQA1 et DQB1 certains allèles sont plutôt protecteurs comme par exemple l'allèle DQ6 (*Erlich et al., 2008*).

Il semble que certains haplotypes du CMH-I sont également associés à une prédisposition au DT1. Après avoir pris en compte la forte influence du CMH-II, une étude a mis en évidence que les allèles exprimés pour les gènes HLA-A et HLA-B peuvent aussi être associés à une prédisposition au DT1 (*Nejentsev et al., 2007*). Comme pour le CMH-II, il existe des allèles qui sont associés à la maladie, tels que HLA-B/39:06, et d'autres qui confèrent plutôt une protection du DT1 tels que le HLA-B/57:01 (*Noble et al., 2010*). En ce qui concerne le HLA-A, l'haplotype HLA-A24 a été particulièrement étudié. Celui-ci est positivement corrélé avec les prédispositions au DT1 (*Mbunwe et al., 2013*).

1b : Les principaux autres loci.

Par le biais d'analyses génomiques et de méta analyses, d'autres gènes de susceptibilité au DT1 ont été mis en évidence tels que : l'insuline (IDDM2), le CTLA-4 (Idd5.1), l'IL-2, l'IL-21 (Idd3), et probablement une phosphatase PTPN22, ou encore IFIH1 (Interferon-Induced Helicase 1) (*Barrett et al., 2009*) (**Figure 19**)... Le rôle de certains de ces

gènes, comme celui de l'insuline, a été observé également dans un modèle murin celui de la souris NOD (*Nakayama et al., 2005*). Chez l'homme, une cartographie du locus IDDM2 a montré que cette prédisposition résidait dans le polymorphisme d'un nombre variable de répétitions en tandems (VNTR) (*Bennett et al., 1995*). Ces travaux suggèrent qu'un faible nombre de répétitions de ces VNTR sur le locus IDDM2 conduit à une faible expression de l'insuline dans le thymus, entraînant une diminution de la sélection négative des LT spécifiques de l'insuline.

Parmi ces loci, celui de l'IL-2 et du CTLA-4 sont impliqués dans la biologie des Treg, ce qui suggère un rôle important de ces cellules dans cette pathologie chez l'homme. Le rôle d'idd3 chez la souris est montré par une expérience élégante : des souris NOD dont le locus idd3 a été remplacé par celui de la souris C57BL/6 ne développent plus de diabète (*Sgouroudis et al., 2008*). Le rôle de ce locus codant pour l'IL-2 dans la susceptibilité au DT1 a aussi été démontré chez l'homme. En effet deux « single-nucléotides polymorphism » (SNP) du locus contenant l'IL-2 sont associés à la susceptibilité au DT1 (*Todd et al., 2007*). De même le locus IDDM10 codant pour la chaîne α du récepteur à l'IL-2, le CD25, présente aussi une susceptibilité au DT1 (*Vella et al., 2005*). Ainsi les variants génétiques de la voie de signalisation de l'IL-2 semblent jouer un rôle important dans le DT1. Le locus idd5 participant à l'expression de CTLA-4 présente 4 sous régions nommés respectivement idd5.1, idd5.2, idd5.3 et idd5.4. Les femelles NOD présentant un locus idd5.1, 5.2, 5.3 de souris C57BL/6 ont une incidence de diabète de 25% au lieu de 80% (*Hunter et al., 2007*). D'ailleurs une étude récente observe que le remplacement combiné des deux loci, idd3 et idd5, permet de prévenir le diabète associé à une réduction presque totale de l'insulite (*Lin et al., 2013*).

Le facteur IFH1 est une hélicase qui reconnaît les ARN double brin viraux. Son activation induit une forte production d'IFN- γ . Selon les variants polymorphiques du gène de IFH1, il a été observé une susceptibilité au DT1 (*Nejentsev et al., 2009; Winkler et al., 2011*). De plus, un autre locus associé à l'immunité antivirale a été identifié comme présentant une susceptibilité au DT1. En effet ce locus code pour différentes protéines dont l'« interferon regulatory factor 7 » (IRF 7). Des études de méta-analyses suggèrent qu'un SNP de ce gène présente une susceptibilité au DT1 (*Heinig et al., 2010*).

Le gène PTPN22 code pour une protéine tyrosine phosphatase LYP (LYmphoid tyrosine Phosphatase). Les variants alléliques de cette protéine confèrent une susceptibilité à

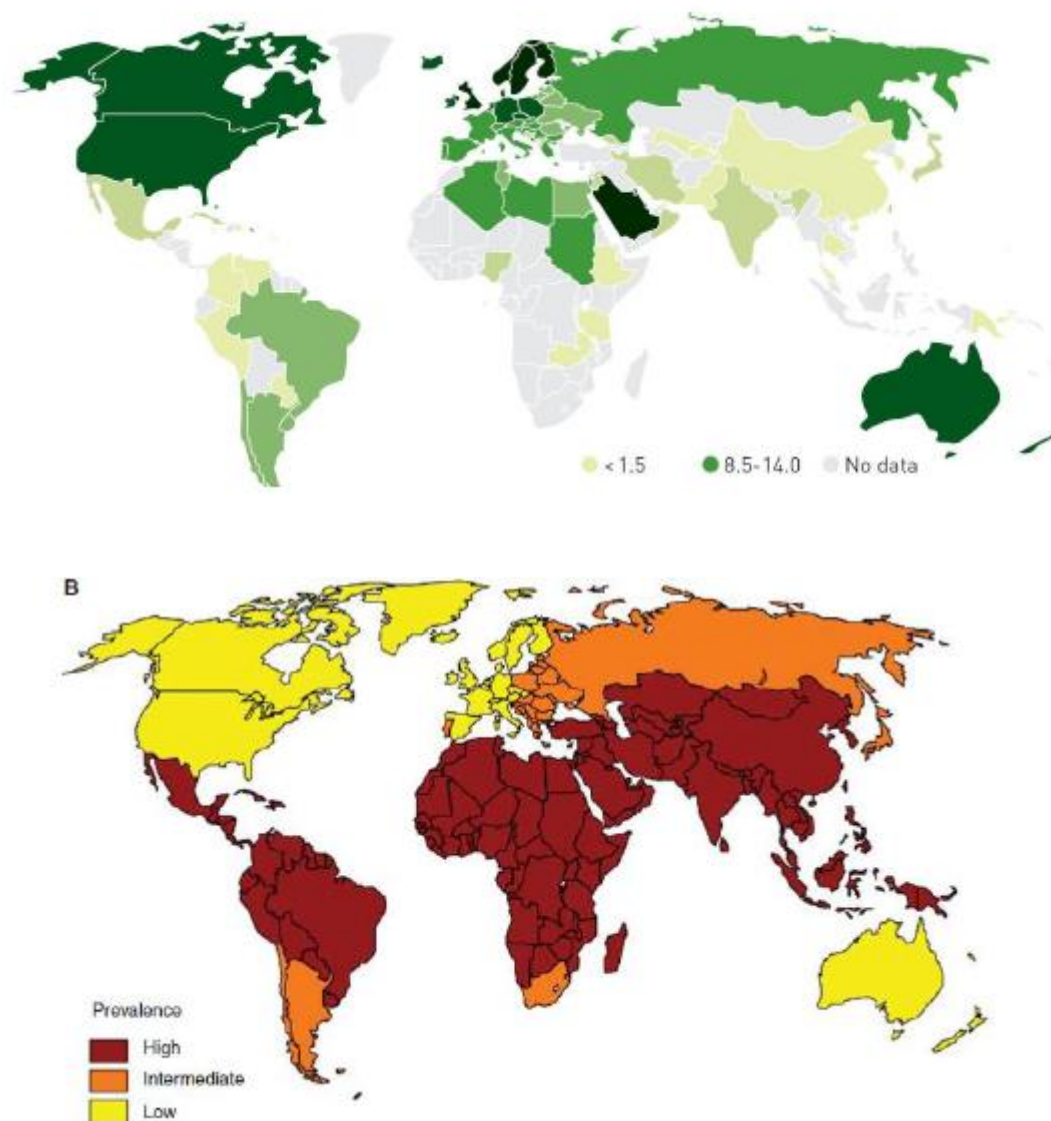


Figure 20. Nouveaux cas de diabète de DT1 répertoriés dans le monde, chez les enfants de moins de 14 ans en 2011, et comparaison avec l'incidence de diarrhée chez l'enfant. D'après IDF Diabetes Atlas, 4th Edition. En haut est représenté le nombre de nouveaux cas d'enfants diabétiques dans le monde, en bas la prévalence de diarrhée chez l'enfant dans le monde. On notera que ces deux répartitions sont selon un axe nord sud opposées (*Bach and Chatenoud, 2012*).

diverses maladies auto-immunes telles que le DT1 (*Bottini et al., 2004; Cooper et al., 2008; Smyth et al., 2004*). La protéine LYP est un important régulateur négatif de la voie de signalisation induite par le TCR (*Wu et al., 2006*). Cependant son mécanisme d'action est controversé et reste à définir: une perte fonctionnelle de cette protéine provoque une diminution de l'activation des LT auto-réactifs, alors qu'un gain fonctionnel diminue la sélection négative des LT auto-réactifs pendant le développement thymique (*Bottini et al., 2006*).

Enfin, par l'utilisation de différentes souches congéniques de souris NOD, d'autres loci ont été mis en évidence comme le locus IDD6, situé sur une région du chromosome 6, qui porte ce gène de susceptibilité au DT1 (*Rogner et al., 2001*). Le locus *idd6* jouerait sur l'activation des Treg (*Rogner et al., 2006*).

2 : Les facteurs environnementaux.

Bien que l'apparition du DT1 semble être contrôlée par des facteurs génétiques, ils n'expliquent pas tout. En effet, il existe plusieurs cas répertoriés où malgré une forte prédisposition génétique, les individus ne développent pas de DT1 (*Steck et al., 2009*). De plus la concordance de DT1 entre jumeaux homozygotes n'est que de 50%. De façon notable, l'incidence du diabète augmente chaque année dans les pays industrialisés et il semble que cette augmentation repose sur des facteurs environnementaux. On distingue parmi ces différents facteurs : les facteurs hygiéniques, les facteurs viraux, bactériens...

2a : La théorie de l'hygiène.

La théorie de l'hygiène s'intéresse aux effets de la réduction de l'exposition aux micro-organismes dès l'enfance sur l'incidence des maladies auto-immunes et des allergies dans nos sociétés développées (**Figure 20**). Cette stimulation immunitaire réduite face aux agents pathogènes induirait une dérégulation du système immunitaire et favoriserait l'auto-immunité. Plusieurs exemples appuient cette hypothèse : les travaux de Leibowitz et ses collaborateurs ont montré que plus le niveau d'hygiène est élevé, plus l'incidence de la sclérose en plaques (SEP) augmente (*Leibowitz et al., 1966*). Une étude a montré que plus l'individu est jeune au moment du contact avec ces agents pathogènes, plus l'effet protecteur sur le diabète est marqué (*McLeod et al., 2011*). D'autre part, l'incidence du diabète est

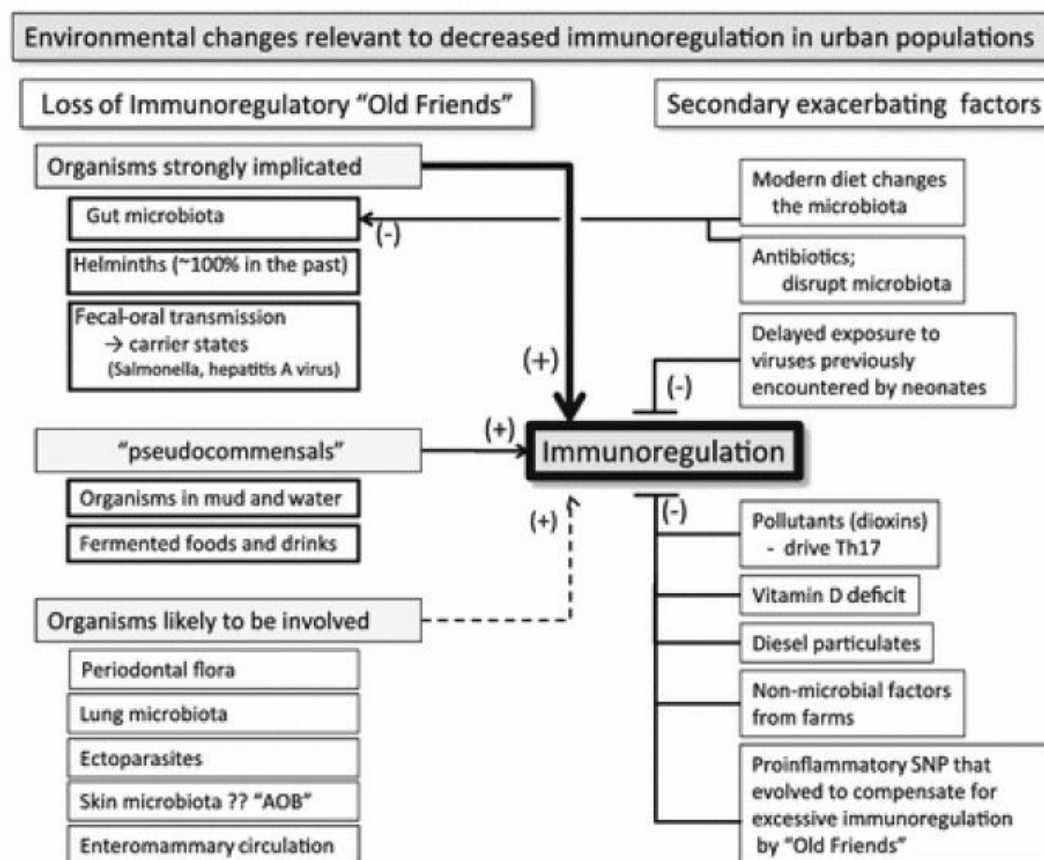


Figure 21. Schéma représentant les facteurs environnementaux. L'environnement peut affecter la susceptibilité au DT1. Ainsi l'alimentation, la prise d'antibiotiques, les conditions d'hygiène changent la flore intestinale et réduisent les risques d'infections parasitaires. Ces facteurs peuvent jouer sur l'activation du SI et donc sur l'incidence du DT1. D'autre part, d'autres facteurs environnementaux peuvent être associés à la maladie comme le déficit en vitamine D, et certains polluants. Issu de (*Rook, 2012*).

inversement corrélée avec celle de la diarrhée chez l'enfant (**Figure 20**). Des données similaires ont été obtenues chez la souris NOD (*Bach, 2002*). Par exemple, une prévention complète du diabète est obtenue lorsque les souris NOD sont infectées par des parasites ou des schistosomes (*Zacone et al., 2009*). Ce phénomène s'expliquerait par le fait qu'une infection précoce et chronique par des bactéries et des parasites intestinaux, les helminthes induiraient une immuno-régulation.

2b : Effet du microbiote et d'autres facteurs.

Le rôle de la flore intestinale, ou du microbiote, fait l'objet de nombreuses recherches actuellement. Chez la souris NOD, l'administration d'un lactobacille les protège contre le diabète (*Aumeunier et al., 2010*). Cette protection serait en partie causée par une augmentation des iTreg (*Di Giacinto et al., 2005*) (**Figure 21**). D'ailleurs, plusieurs études ont montré une réduction du taux de Treg dans l'intestin de souris présentant une absence de bactéries commensales (*Chinen et al., 2010*). Il semble que la présence de *Clostridium* permette l'activation et l'induction des Treg (*Atarashi et al., 2011; Geuking et al., 2011*).

D'autres travaux menés par le groupe de D Litman montrent que la seule présence d'une bactérie appelée SBF (Segmented Filamentous Bacteria) suffit à perturber le microbiote entraînant une activation des lymphocytes Th-17 (*Ivanov et al., 2009*). D'ailleurs la présence de cette bactérie induit aussi une protection contre le DT1 (*Kriegel et al., 2011*).

L'incidence du diabète des femelles NOD contenant la SBF est de seulement 20% contre 80% chez les témoins. Une autre étude a montré qu'en transférant le microbiote intestinal de femelles à des mâles, les mâles deviennent alors plus susceptibles au DT1. Ces données suggèrent que le microbiote influence sur l'incidence du DT1, en partie en modulant les taux d'hormones sexuelles (*Markle et al., 2013*).

Ces dernières années, de nombreux travaux ont montré que certains composants environnementaux non infectieux influencent l'incidence du diabète. C'est le cas de la vitamine D, du gluten, des antibiotiques ou encore du lait de vache. La vitamine D est connue pour être un inhibiteur de la différenciation des DC et par conséquent de la réponse immune. D'ailleurs, l'administration de vitamine D diminue l'incidence du diabète chez la souris (*Mathieu et al., 1994*). Le lait de vache, plus particulièrement l'ovalbumine qui le compose, serait un facteur aggravant l'auto-immunité. Un des mécanismes serait que les anticorps anti-

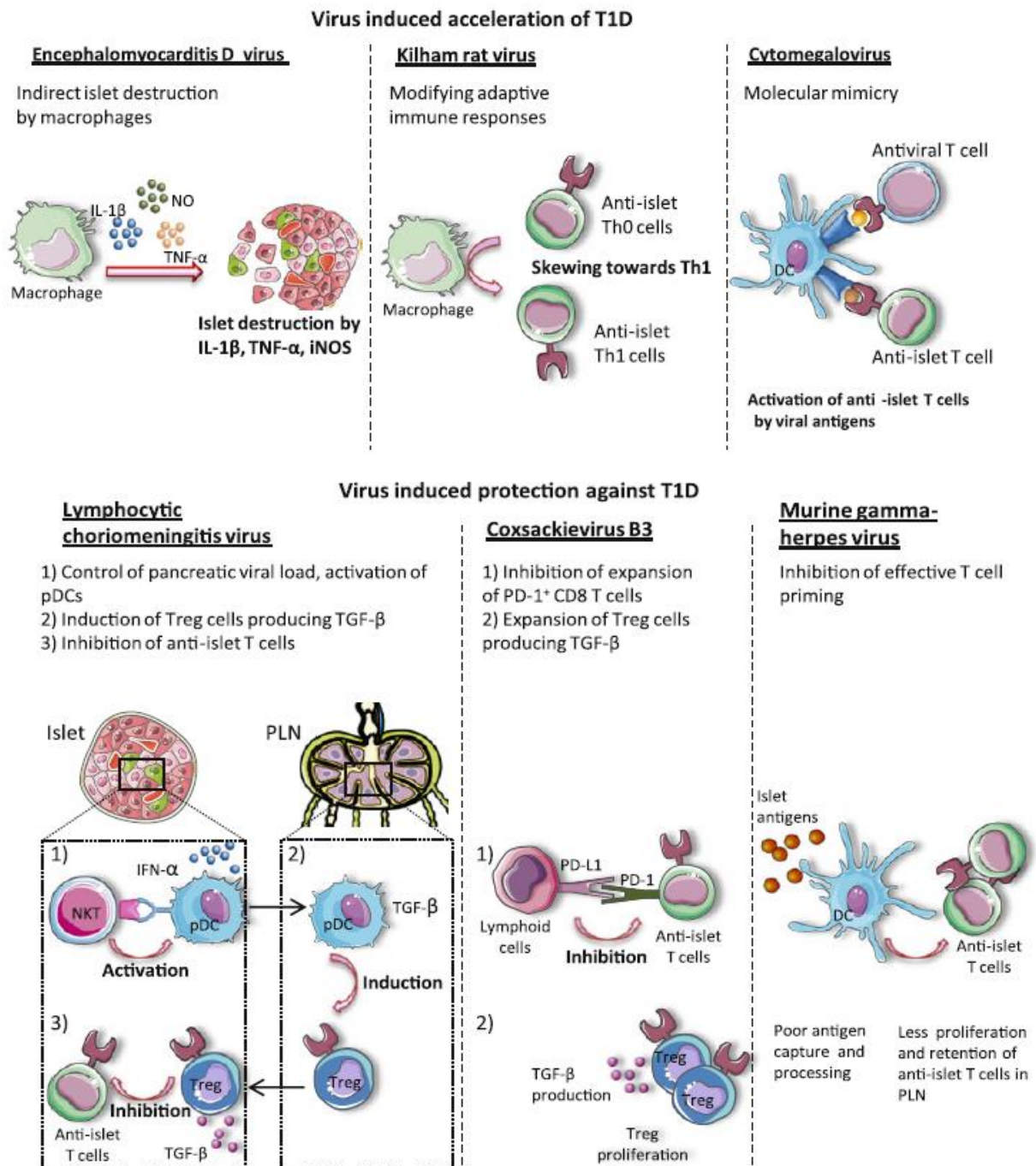


Figure 22. Représentation schématique de l'effet inducteur ou protecteur des virus sur l'induction du DT1 Les virus peuvent participer à la pathogénèse par différents mécanismes, soit en induisant une forte inflammation produisant des cytokines potentiellement dangereuses pour les cellules β, en orientant la réponse immune vers un profil Th1 pathogène, ou simplement par mimétisme moléculaire entre antigènes microbiens et auto-antigènes. Cependant, certaines infections pourraient avoir un effet protecteur via l'induction de Treg, en diminuant la capacité des CPA à présenter les auto-antigènes ou en favorisant l'activation de pDC toléro-gènes. Issu de (Ghazarian et al., 2013).

OVA présentent une réactivité croisée avec l'antigène ICA-1 des cellules β (*Karjalainen et al., 1992*). Toutefois ces données sont controversées dans la mesure où l'incidence du diabète est identique chez les nouveau-nés NOD ayant reçu du lait de vache ou du lait maternel (*Paxson et al., 1997*).

2c : Le diabète a-t-il une origine virale ?

Nous avons vu préalablement que certains facteurs génétiques du DT1 tels que l'IFH1 et l'IRF7 peuvent jouer un rôle dans la réponse immune aux infections virales. Ces données appuient l'hypothèse d'une origine virale possible du DT1. Les virus peuvent favoriser l'induction de la maladie par différents mécanismes tels que : (i) le mimétisme moléculaire où les antigènes viraux pourraient présenter des similitudes avec les antigènes pancréatiques ; (ii) l'activation du système immunitaire par des virus qui stimuleraient des LT auto-réactifs, par effet « bystander » ; (iii) l'augmentation du taux d'auto-antigènes provoqué par la mort des cellules β consécutive à l'inflammation provoqué par une infection virale dans le pancréas (**Figure 22**).

De nombreux virus pourraient potentiellement déclencher un DT1 comme les rotavirus, le cytomégalovirus (CMV) ou les entérovirus. Certaines de ces protéines virales possèdent une forte homologie de séquences peptidiques avec les auto-antigènes du pancréas. Il y aurait une activation des LT auto-réactifs par mimétisme moléculaire, initiant la pathologie. Par exemple l'équipe de Honeyman a montré que suite à une infection avec un rotavirus, ils observent une corrélation positive entre l'apparition d'IgG antivirales et d'auto-anticorps (*Honeyman et al., 2000*). D'autre part chez l'homme, une étude récente a démontré que le CMV peut infecter directement les cellules β , causant une réaction inflammatoire locale (*Smelt et al., 2012*). La famille des entérovirus, et particulièrement les virus Cocksackie seraient des candidats sérieux à l'induction du DT1. Les virus Cocksackie de souche B4 ont été décrits pour leur capacité à infecter les thymocytes, perturbant ainsi le répertoire T, et précipiteraient le diabète chez la souris (*Chatterjee et al., 1992*). De plus, plusieurs études ont montré que les virus Cocksackie présentent une protéase virale 2C qui a une forte homologie de séquence avec GAD 65, un antigène contre lequel il y a un grand nombre d'auto-anticorps produits (*Lehuen et al., 2010*).

Par ailleurs, il semble que certains virus pourraient également présenter un rôle protecteur du diabète. En effet, le contact répété avec les virus permettrait le contrôle de l'inflammation dans le pancréas (*Bach, 2002*). De plus, la majorité des infections virales déclenchent une activation des Treg (*Diana et al., 2011*). Dans les années 1990, les travaux de Oldstone démontrent que l'infection de souris NOD par le LCMV prévient le développement du DT1 (*Oldstone, 1988*). Plus tard, d'autres équipes ont proposé plusieurs explications pour ce phénomène. Il y aurait une inhibition du recrutement des LT dans le pancréas (*Christen et al., 2004*) une activation des iNKT (*Laloux et al., 2001*) et des pDC tolérogènes dans le pancréas et les ganglions drainants (*Diana et al., 2009*).

Toutefois, aucune donnée épidémiologique n'a pu confirmer une origine virale du DT1 chez l'homme, ce qui remet en question qu'une telle infection soit un facteur majeur du déclenchement de la maladie.

D : Les principaux acteurs cellulaires du diabète.

Le développement du DT1 implique une interaction complexe entre le système immunitaire inné et adaptatif. Nous avons abordé précédemment le rôle multifactoriel de facteurs environnants ou génétiques qui peuvent jouer sur l'activation du système immunitaire. Elle s'effectue en plusieurs étapes : initiée par les cellules de l'immunité innée puis amplifiée par le système immunitaire adaptatif. L'induction de la maladie requiert l'intervention des LT CD4 et CD8 (**Figure 23, 24**).

1 : Les cellules de l'immunité innée.

Les cellules de l'immunité innée ont la capacité d'orienter le type de réponse en synthétisant des cytokines pro-inflammatoires ou immuno-régulatrices. Par conséquent elles ont un rôle ambivalent dans le développement du DT1.

1a : Le rôle des macrophages.

Chez la souris NOD, vers 2-3 semaines d'âge, il a été observé une vague de mort des cellules β , ce qui a pour conséquence une augmentation de la présentation d'auto-antigènes. Dans les années 1990, une première étude a mis en évidence le rôle pathogène des macrophages infiltrant le pancréas. En effet l'administration d'un anticorps bloquant une molécule d'adhésion spécifique des macrophages, le CR3, prévient l'apparition du DT1

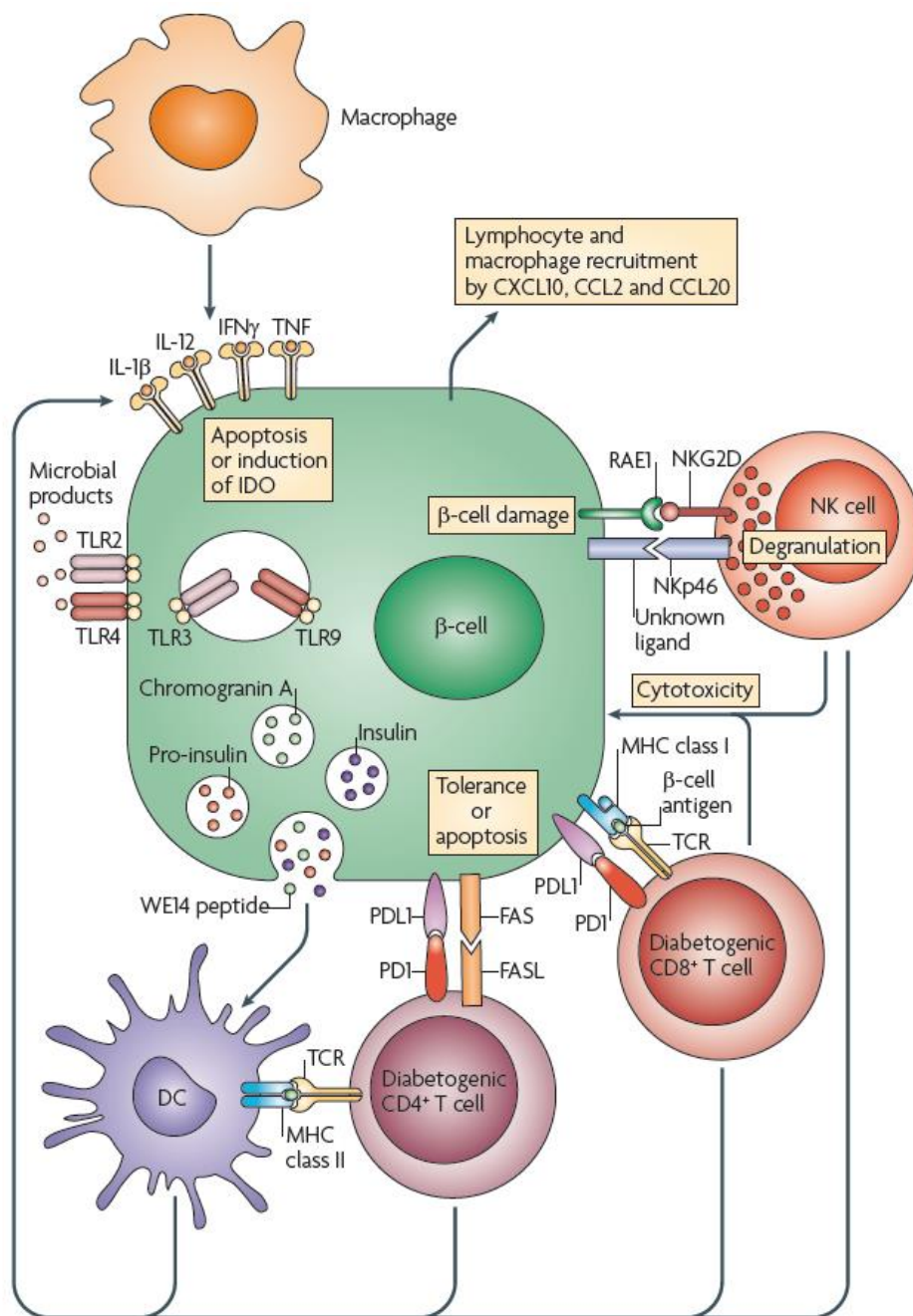


Figure 23. Interaction entre les cellules immunitaires et les cellules β . Les TLR (Toll-like Receptor) sont exprimés par les cellules β dans le but de détecter les produits microbiens. Pendant l'inflammation, les macrophages, DC, NK, et les LT pathogènes vont sécréter de l'IL-12, l'IL-1- β , l'IFN- γ et du TNF ce qui peut provoquer l'apoptose des cellules β . Les cellules β vont aussi sécréter des chimiokines attirant les macrophages et autres cellules immunitaires. Les NK se fixent aux cellules β par l'intermédiaire de NKG2D/ RAE1 ou NKp46 et son ligand ce qui peut provoquer leur dégranulation. Enfin les cellules β expriment aussi FAS et PDL-1 provoquant soit l'induction de la tolérance, soit l'apoptose des LT. Issu de (Lehuen et al., 2010).

(*Hutchings et al., 1990*). D'autres travaux menés *in vivo* et *in vitro* ont montré que les macrophages peuvent induire directement la mort des cellules β en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF, l'IL-1- β et des dérivés réactifs oxygénés (ROS) (*Arnush et al., 1998; Uno et al., 2007*). De façon intéressante, les macrophages pro-inflammatoires sont recrutés dans le pancréas avant même l'infiltration des LT (*Dahlen et al., 1998*). Le recrutement de ces macrophages au site de l'inflammation serait induit par la présence de CCL-1 et CCL-2 produits en partie par les îlots (*Cantor and Haskins, 2007; Martin et al., 2008*). D'après ces études les macrophages auraient un rôle initiateur dans le DT1. D'autre part, les macrophages ont la propriété de sécréter de l'IL-12, ce qui active les LT Th1 et CD8 cytotoxiques (CTL) participant à la destruction des cellules β (*Jun et al., 1999*).

L'ensemble de ces études montre que les macrophages ont un effet néfaste sur le pancréas à différents niveaux, soit en sécrétant des cytokines délétères pour les îlots, soit en recrutant et en présentant les auto-antigènes aux LT pathogènes. Toutefois certains travaux ont montré que les macrophages auraient un rôle protecteur du DT1 (*Yin et al., 2010*). L'équipe de D Mathis et C Benoist a mis en évidence une population de macrophages régulateurs infiltrant le pancréas. La présence de ces cellules vers 6-10 semaines déterminerait si les souris vont devenir diabétiques ou pas (*Fu et al., 2012*).

Ib : Les NK.

D'une façon générale les cellules NK sont connues pour leur propriété antivirale et leur capacité à tuer les cellules tumorales. Parmi les mécanismes d'action des NK on retrouve aussi l'importance de la sécrétion de cytokines, comme l'IFN- γ , ou des propriétés cytotoxiques. Pourtant ces cellules jouent un rôle à la fois positif et négatif dans le DT1.

En effet, les NK recrutées dans le pancréas participeraient directement ou indirectement à l'induction du diabète en agissant sur les cellules β . D'ailleurs la proportion de NK infiltrant le pancréas de la souris NOD est de l'ordre de 1 à 3 % de l'infiltrat, ce qui est assez important (nos données) (*Alba et al., 2008; Feuerer et al., 2009b*). Les NK isolées du pancréas de ces souris présentent un phénotype plus activé que celles issues de la rate ou des ganglions pancréatiques. En effet ces cellules expriment plus fortement le CD69, le PD-1, le KLRG1 (Killer cell lectin like receptor group G-1) mais aussi le CD107 qui est un marqueur de dégranulation. De plus, une étude a montré que l'inhibition des NK par un anticorps bloquant un récepteur spécifique, le NKp46, prévient l'apparition du diabète. Dans cette étude, les

auteurs mettent en évidence que les NK interagissent directement avec les cellules β via le ligand de NKp46 (*Gur et al., 2010*). Les NK peuvent aussi entrer en contact avec les cellules β via le ligand de NKG2D, le RAE-1 (Retinoic Acide Early Transcript 1), causant potentiellement la destruction des cellules β . L'ensemble de ces données montre le rôle pathogène des NK dans le DT1.

Toutefois, d'autres travaux contredisent ces observations et indiquent que les NK auraient un rôle plutôt protecteur. *Ex vivo* les NK issues des organes lymphoïdes de souris NOD ou de sang de patients auraient une fonction altérée (*Ogasawara et al., 2003; Rodacki et al., 2007*). L'hypothèse est que le défaut fonctionnel des NK serait présent avant l'apparition de la maladie et par conséquent leur rôle dans le DT1 ne serait que secondaire. De plus, chez les patients atteints de sclérose en plaques, il a été décrit que la proportion de NK CD56^{high} serait associée à un bon pronostic (*Bielekova et al., 2006*).

1c : Les NKT.

Selon le type de NKT, ces cellules peuvent être néfastes ou protectrices du DT1. En effet les iNKT CD4⁺ seraient plutôt protectrices alors que les iNKT17 participeraient à l'initiation de la maladie. D'ailleurs les souris NOD possèdent plus de iNKT que d'autres souches murines ne faisant pas de DT1. Le rôle protecteur des iNKT CD4⁺ se ferait en orientant la réponse immune vers un profil TH-2 (*Beilke et al., 2005*). De plus, une étude a démontré dans un modèle de diabète *in vivo*-induit par le virus "Lymphocytic Chorio-Meningitis Virus" (LCMV) que les iNKT activent la sécrétion de TGF- β par les pDC. Ce qui favoriserait l'induction de iTreg et préviendrait l'apparition du DT1 (*Diana et al., 2011*). Toutefois chez l'homme, le rôle de ces cellules est moins évident. En comparaison avec des sujets sains, les patients atteints de DT1 présentent un nombre variable de iNKT CD4⁺ ou iNKT17 à la périphérie (*Lee et al., 2002*). Un autre type de NKT, les NKT de type II reconnaissent des antigènes lipidiques via le CD1d mais possèdent un TCR plus varié que leurs homologues (*Kadri et al., 2008*). Ces cellules présenteraient un rôle protecteur du DT1. Une étude récente a montré que le transfert adoptif de ces NKT de type II permet la prévention du DT1. Cette prévention dépendrait de l'interaction de ICOS/ICOS-L et de PD-1, PDL-1 (*Kadri et al., 2012*).

1d : Les cellules dendritiques.

Les DC présentent également un rôle ambivalent dans la physiopathologie du DT1. Les DC captureraient et présenteraient des antigènes d'îlots pancréatiques aux LT pathogènes. D'ailleurs cette hypothèse fut testée dans un modèle de souris transgénique exprimant une glycoprotéine du LCMV sous le contrôle du promoteur de l'insuline de rat : RIP ("Rat Insulin Promotor"). Dans ce modèle, l'injection répétée de DC conventionnelles exprimant un épitope immuno-dominant de cette glycoprotéine aboutit à une destruction massive des îlots pancréatiques induite par les CTL (*Ludewig et al., 1998*). D'autres études ont montré que les antigènes libérés par la destruction des cellules β sont capturés par les DC et présentés aux LT. Il en résulte une activation des LT pathogènes (*Marleau et al., 2008*). En l'occurrence, la mort initiale des cellules β serait physiologique ou causée par des infections virales. (*von Herrath et al., 2003*). De façon notable, une sous-population de DC, les pDC, a la capacité d'être activée par les ARN viraux, ce qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- α et l'IL-12 (*Reizis et al., 2011*). D'ailleurs, chez la souris NOD, une étude a montré que l'avancement du DT1 est positivement corrélé avec l'augmentation des pDC dans les ganglions drainants et à l'augmentation de la production d'IFN- γ (*Li et al., 2008*). De plus, une étude récente a montré que, par l'intermédiaire des LB et des neutrophiles, les pDC IFN- α^+ sont initiateurs du DT1 (*Diana et al., 2013*).

En revanche, d'autres études suggèrent que les patients présentant une altération fonctionnelle des DC peuvent développer un diabète (*Wang et al., 2010a*). Cette étude remet en cause les hypothèses précédentes. En effet, le traitement des souris NOD avec le G-CSF mobilise les DC et prévient le DT1. D'ailleurs, cette étude montre une augmentation des pDC et des DC dans la rate après traitement au G-CSF (*Kared et al., 2005*). Les DC participeraient à la tolérance en activant les Treg par la production de TGF- β et par d'autres mécanismes abordés précédemment, comme l'engagement de la voie PD-1 ou ICOS ...

En résumé, les DC ont un rôle ambivalent dans la physiopathologie du DT1. Ils peuvent à la fois participer à l'activation des LT auto-réactifs mais aussi favoriser les Treg.

1e : Les neutrophiles.

Des études récentes suggèrent que les neutrophiles participeraient à l'initiation du DT1. En effet chez la souris NOD âgée de quelques semaines, il a été observé une augmentation des neutrophiles dans le pancréas (*Diana et al., 2013*). Chez l'homme, une autre

étude montre une augmentation de ces cellules dans le pancréas de patients nouvellement diabétiques (*Valle et al., 2013*). Ces données suggèrent que les neutrophiles pourraient participer à la destruction des cellules β et à l'initiation de la maladie.

2 : Les lymphocytes B, et les anticorps anti-îlots.

L'infiltrat pancréatique des souris NOD contient une forte proportion de LT mais aussi de LB. Le rôle des LB dans le diabète est cependant débattu (*Pescovitz et al., 2009*). Chez les souris NOD, l'injection d'un anticorps déplétant les LB prévient la maladie et a même un effet curatif (*Hu et al., 2007*). Chez l'homme un essai clinique récent montre que le traitement par un anticorps anti-CD20 déplétant, le rituximab, semble avoir un effet bénéfique sur le DT1 (*Herold et al., 2011*). Cependant des résultats complémentaires sont nécessaires. Les LB pourraient participer à la pathogénèse par différents mécanismes : (i) Les LB sont des CPA, connus pour leur capacité à présenter les auto-antigènes aux LT auto-réactifs (*Bouaziz et al., 2007; Brodie et al., 2008*), (ii) ils participeraient à l'initiation du DT1 (*Diana et al., 2013*), (iii) les LB activés produisent des auto-anticorps potentiellement néfastes pour le DT1. En ce qui concerne les auto-anticorps produits par ces cellules comme l'I-A2 (Insulinome Antigen Associated 2), l'insuline, GAD 65 et le ZnT8 (Zinc Transporter 8) sont détectés généralement avant l'apparition du diabète clinique chez l'homme. La détection de ces auto-anticorps est d'ailleurs utilisée en clinique pour le diagnostic ou la prédiction du DT1. Toutefois chez la souris NOD, seuls les anticorps anti-insuline ont été clairement définis comme cible spécifique. Ces auto-anticorps peuvent détruire les cellules β par "antibody dependent cell cytotoxicity" (ADCC) ou participer à la présentation antigénique en se complexant avec les auto-antigènes (*Harbers et al., 2007*). Une étude a montré dans la souris NOD que la transmission d'anticorps auto-réactifs par le lait maternel augmente les risques de développer un DT1 (*Greeley et al., 2002*). Inversement, l'injection d'immunoglobulines de souris diabétiques à des souris NOD déficientes en LB n'induit pas de DT1 (*Wong et al., 2004*). Cette donnée suggère que les auto-anticorps en soi n'ont pas de rôle pathogène majeur. Enfin, dans le but de déterminer le rôle de ces auto-anticorps, une équipe a créé une souris transgénique dont les LB expriment des IgM non sécrétoires. Ces souris développent une insulite et un DT1, confirmant le rôle secondaire des auto-anticorps dans le DT1 (*Wong et al., 2004*).

3 : Les LT spécifiques du pancréas.

Les LT spécifiques d'antigènes d'îlots sont des acteurs essentiels de la destruction des cellules β . Une des premières mises en évidence du rôle des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ dans le DT1 a été réalisée en transférant des LT issus de NOD à des hôtes de même fond génétique immunodéficients (NOD.scid) (*Christianson et al., 1993*).

Dans le DT1, ces LT reconnaissent une grande variété d'auto-antigènes, tels que l'insuline, GAD, la chromogranine A ou "Islets-Glucose-6-Phosphatase catalytic submit related Protein" (IGRP). D'ailleurs, le transfert adoptif de clones T spécifiques d'antigènes pancréatiques est capable d'induire un diabète chez la souris NOD (*Stadinski et al., 2010; Zekzer et al., 1998*). De façon schématique, l'activation des LT $CD8^+$ auto-réactifs peut se faire dans le ganglion drainant (*Lennon et al., 2009*) ou directement au sein du pancréas (*Wang et al., 2010b*). Une fois les LT $CD8^+$ activés par les APC, les CTL vont participer à la destruction des cellules β , soit par la libération de perforine et granzyme, soit par FAS. Les LT $CD4^+$ comme les LT $CD8^+$ peuvent aussi détruire directement les cellules β grâce à la sécrétion de cytokines toxiques comme l'IFN- γ ou le TNF α . En réponse à l'IFN- γ et à l'IL-1, les cellules β vont exprimer plus fortement FAS ce qui augmente leur sensibilité à être détruites par les LT pathogènes (*Amrani et al., 2000*). De plus dans des conditions inflammatoires, les cellules β vont exprimer le TNFR-1. Une délétion de l'expression de ce récepteur à la surface de ces cellules les protège de l'attaque auto-immune (*Pakala et al., 1999*).

Toutefois, il semble que les LT $CD8^+$ nécessitent le "help" des LT $CD4^+$ pour s'activer et induire le diabète. En effet plusieurs études appuient cette hypothèse. Par exemple, dans un modèle de souris NOD, le transfert adoptif de LT $CD8^+$ spécifiques d'un antigène d'îlots pancréatiques ne peuvent pas migrer dans le pancréas en l'absence de LT $CD4^+$ (*Verdaguer et al., 1997*). En revanche une autre étude a montré que les LT $CD8^+$ issus de souris transgéniques présentant un TCR spécifique d'îlots pancréatiques sont capables d'induire le DT1 même en absence des LT $CD4^+$ (*Graser et al., 2000*).

Enfin des études récentes ont montré que, parmi ces LT $CD4^+$, les Th-17 pouvaient avoir un rôle dans le développement de la maladie à la fois chez l'homme et chez la souris (*Emamaullee et al., 2009; Honkanen et al., 2010; Lee et al., 2013; Mensah-Brown et al., 2006*).

4 : Le rôle des Treg dans le contrôle de l'auto-immunité.

Chez la souris NOD, l'infiltrat commence dès 2 semaines de vie mais les souris deviennent diabétiques bien plus tard. Le temps très long entre le début de l'insulite et le

diabète clinique est dû à de nombreux facteurs. L'un d'entre eux est le ralentissement de l'évolution pathogénique du DT1 par les Treg. En effet, si les Treg sont déplétés vers 6-8 semaines, la maladie surgit beaucoup plus rapidement (*Billiard et al., 2006*). Dans un modèle de souris transgéniques TCR-BDC2.5, où la majorité des LT est spécifique d'un antigène d'îlot pancréatique (*Stadinski et al., 2010*), celles-ci ne développent pas de DT1 (*Katz et al., 1993*). Pourtant le pancréas de ces souris présente une insulite importante. Ces données suggèrent que dans ces souris les Treg pourraient contrôler la tolérance. Cette hypothèse fut confirmée avec la création du modèle TCR-BDC 2.5x SCID. Ces souris ne possèdent pas de Treg et développent ainsi un diabète fulminant (*Kanagawa et al., 2002*). Plus récemment, chez les souris TCR-BDC2.5 x Foxp3^{DTR} dans lesquelles les Treg peuvent être déplétés après l'injection de toxine diphtérique, on observe une très forte destruction de leurs cellules β seulement deux jours après la déplétion des Treg. De façon intéressante, dans ce modèle murin, la disparition des Treg provoque une forte activation des cellules NK puis secondairement des LT CD4 (*Feuerer et al., 2009b*).

Pour quelle raison la régulation du DT1 par les Treg est-elle insuffisante pour prévenir le diabète dans certains animaux ? Plusieurs facteurs pourraient expliquer ce phénomène, comme une diminution de la proportion de Treg avec l'âge (*Chatenoud and Bach, 2005*). Cependant, d'autres travaux menés montrent le contraire avec une augmentation de la proportion et de la prolifération des Treg dans les ganglions drainants et le pancréas à l'apparition des symptômes (*Mellanby et al., 2007; Tang et al., 2008*). Un autre facteur serait une diminution de la fonction suppressive des Treg au cours du temps mais là aussi les données sont discordantes. *In vitro*, les Treg issus de souris pré-diabétiques ou diabétiques semblent très bien supprimer les Tconv (*D'Alise et al., 2008; You et al., 2005*). En revanche, *in vivo*, les Tconv diabétogènes injectés à des souris âgées de 4 à 8 semaines sont supprimés par les Treg endogènes; alors que des résultats opposés sont obtenus avec des souris âgées de 16 semaines (*Gregori et al., 2003; Pop et al., 2005*). Enfin, un dernier facteur serait que les Tconv deviennent réfractaires à la suppression des Treg. D'ailleurs les Tconv des souris NOD s'activent plus facilement et prolifèrent plus *in vitro* que d'autres lignées, ce qui pourrait expliquer cette résistance (*D'Alise et al., 2008*). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme (*Lawson et al., 2008*). Du fait du rôle important des Treg dans la régulation de la maladie, des essais de thérapie cellulaire par l'injection de Treg induits *in vitro* ou naturels

sont en cours ou à l'étude (*Battaglia and Roncarolo, 2011*) (NCT01210664). On notera que chez l'homme le rôle des Treg est plus difficile à mettre en évidence.

II : Les thérapies du diabète de type I

Aujourd'hui il existe un très bon traitement palliatif du DT1, l'insuline ! L'ajout d'insuline exogène permet de compenser l'insulinopénie provoquée par la destruction des cellules β des îlots pancréatiques. Ce traitement contraignant oblige les patients à surveiller régulièrement leur glycémie et à s'injecter plusieurs fois par jour de l'insuline, ou à avoir une pompe à insuline avec débit programmé. De plus, ce traitement ne prévient que partiellement les complications associées à la maladie (*Gan et al., 2012*). Ainsi, plusieurs essais cliniques ont été effectués ces dernières années dans le but de trouver des traitements préventifs et curatifs. Différentes stratégies ont été employées comme la greffe d'îlots pancréatiques, de pancréas, de cellules souches, des traitements immunosuppresseurs... Ici, j'aborderai de façon non exhaustive les différents essais cliniques immuno-modulateurs à visée curative. Hors greffe, ces thérapies reposent sur le fait qu'à la déclaration de la maladie, il reste des cellules β fonctionnelles. Ces cellules β pourraient se régénérer et produire suffisamment d'insuline pour réguler la glycémie tout au long de la vie.

Afin d'évaluer l'efficacité de ces thérapies les taux sanguins de peptide C et d'hémoglobine glyquée sont mesurés. Le peptide C correspond à un fragment peptidique de la pro-insuline qui est produit en même temps que l'insuline. La mesure de sa concentration sérique permet d'avoir une estimation de l'insuline produite (endogène). L'hémoglobine glyquée (fraction HbA1C) est une valeur biologique qui permet de déterminer la glycémie moyenne sur les 3 derniers mois.

Il existe de nombreux essais cliniques qui ont pour but de moduler la réaction immune afin de stopper l'attaque auto réactive des cellules β du pancréas. Ces essais abordent différentes stratégies comme par exemple les thérapies basées sur l'immunosuppression ou encore le transfert de cellules.

A : Les thérapies antigène-spécifiques.

Le but de ces thérapies est d'augmenter le niveau de tolérance spécifique à certains auto-antigènes impliqués dans le DT1. Chez la souris NOD, des stratégies d'induction de

tolérance avec des peptides de l'insuline ou de GAD 65 se sont avérées efficaces (*Kaufman et al., 1993*). Malheureusement, chez l'homme, ces approches n'ont pas donnée d'effets bénéfiques.

De nombreux essais cliniques ont ciblé l'insuline, cette protéine étant décrite chez la souris NOD comme un des premiers antigènes initiateurs du DT1 et représentant un des auto-antigènes majeurs chez l'homme (*Keller, 1990*). Un exemple d'essai clinique de phase I est la vaccination avec la chaîne B de l'insuline couplée avec un adjuvant incomplet de Freund, chez des patients nouvellement diagnostiqués (*Muir et al., 1995; Orban et al., 2010*). Cette vaccination ne présente pas de danger et permet une induction de Treg spécifiques de l'insuline que l'on retrouve encore deux ans après vaccination. Une autre approche consiste à utiliser une vaccination par ADN codant pour la pro-insuline vectorisée dans un plasmide (Bayhill Therapeutics). La stratégie de ce vaccin est d'induire une tolérance du système immunitaire vis-à-vis d'un peptide de la pro-insuline (*Urbanek-Ruiz et al., 2001*). L'effet de cette vaccination chez le modèle murin réside en l'induction des Treg spécifiques de l'insuline. D'autre part, chez l'homme, l'essai clinique de phase I/II mené chez des patients récemment diagnostiqués ne montre pas de différence du taux de peptide C entre le groupe placebo et le groupe traité.

Un autre essai clinique a consisté à immuniser des patients avec la protéine " Glutamic acid decarboxylase " (GAD) humaine recombinante formulée avec un adjuvant, l'Alum (Hydroxyde d'aluminium) (Diamyd Therapeutics). En phase II cet essai indiquait une réponse spécifique dirigée contre GAD mais le taux d'insuline utilisée et le taux d'hémoglobine glyquée, HbA_{1c} restent inchangés (*Agardh et al., 2005; Wherrett et al., 2011*). Actuellement en phase III, il inclut des patients âgés de 10 à 20 ans, choisis pour leur fort taux d'auto-anticorps anti GAD. Les résultats montrent une augmentation des Treg et du TGF- β mais une diminution non significative du taux de peptide C chez les patients traités (*Ludvigsson et al., 2012*).

Enfin un autre peptide d'intérêt thérapeutique est le diapPep277. Ce peptide est un composant de la protéine " Heat shock protein 60 " (HSP60) qui est connue comme étant un auto-antigène dans le DT1 chez l'homme et la souris (*Elias et al., 2006*). Cependant, une étude indique que DiaPep277 a un rôle régulateur dans la voie de signalisation des TLR (*Horvath et al., 2002*). Un essai clinique de phase II montre que le traitement par DiapPep277 préserve le taux de peptide C chez les patients nouvellement diabétiques (*Raz et al., 2007*). De plus la

thérapie	cible / mécanisme	phase	résultats	références
Cyclosporine A	suppression immunitaire		rémission observée pendant le traitement mais de sévères effets secondaires.	<i>Assan. et al 1985; Bougnères. et al 1990;</i>
ATG Thyroglobuline/Atgam	déplétion des LT et régénération des Treg	phase II (arrêt)	danger, peut causer un orage cytokinique	<i>Simon. et al 2008</i>
Anti-CD3 (hOKT3) (Ala-Ala) Teplizumab	Immunomodulation des LT	Phase I/II	préservation du taux de peptide C, Effet sur plus de 36 mois	<i>Herold. et al 1992, Herold. et al 2002, Herold. et al 2009.</i>
Teplizumab		Phase III (en cours)	les résultats préliminaires ne montrent pas d'effet majeur	<i>Sherry. et al 2011.</i>
Anti-CD3 (ChAglyCD3) Otelixizumab	Immunomodulation des LT et génération de iTreg.	Phase II/III	préservation du taux de peptide C, Effet sur plus de 18 mois, risque de réactivation du virus EBV.	<i>Keymeulen. et al.; 2005; Keymeulen. et al.; 2010</i>
Otelixizumab		phase III	pas d'effet, dose probablement trop faible	<i>Torlex Inc mars 2011.</i>
Anti-CD20 mAb Rituximab	déplétion des LB	Phase II/III	amélioration du taux de peptides C après 12 mois	<i>Hu. Et al 2007, Pescovitz. Et al 2009</i>
Anti-IL-1B (anakinra/ Canakinumab)	anti-inflammatoire, et préservation des îlots.	Phase II/III	En cours, les résultats préliminaires ne montrent pas d'effet	<i>Mandrup-Poulsen. et al.; 2012, Moran A. et al; 2012</i>
Anakinra		II		
Canakinumab		II		
inhibition du TNF- α : Etanercept.	Anti-inflammatoire	Phase I/II	diminution du taux de HbA-1 et des besoins en insuline, augmentation du taux de peptide C mais l'inhibition du TNF augmente les risques de contraction de la tuberculose.	<i>Mastrandrea. et al 2009</i>
Cellules souches hématopoïétiques (CSH)	restauration du système immunitaire	Phase I/II	cas d'insulino-indépendance.	<i>NCT01285934</i>
IL-2 / rapamycine		Phase I/II	accélération de la maladie, diminution du taux de peptide C	<i>Long SA. et al.; 2012</i>
IL-2 seul	Immunomodulation en favorisant les Treg.	Phase I/II	le premier essai visait à détecter à déterminer une dose ne présentant pas d'effets secondaires	<i>NCT01353833</i>

Tableau 5. Liste non exhaustive des essais thérapeutiques non antigène spécifique chez l'homme.

préservation des cellules β est associée à une augmentation de l'IL-10, cytokine immunorégulatrice, après traitement (*Huurman et al., 2008*). Actuellement, cette cible est en essai de phase III, les résultats préliminaires ne montrent pas d'effet chez les jeunes enfants mais seraient plus prometteurs chez l'adulte (*Lazar et al., 2007*).

B : Les thérapies non antigènes spécifiques (Tableau 5).

1: Les immunosuppresseurs classiques.

Depuis la découverte du rôle du système immunitaire dans le DT1, de nombreux essais ont émergé dans le but d'inhiber la réponse immune. De façon notable, même si certains de ces essais n'ont pas d'effet direct sur la maladie, ils peuvent tout de même être pris en considération comme traitement immunosuppresseur dans le cas de greffe d'îlots.

1a : La cyclosporine A.

Un exemple de traitement immunosuppresseur est la cyclosporine A. Cette molécule inhibe la calcineurine qui peut être un activateur de la transcription de l'IL-2. L'hypothèse serait que le défaut en IL-2 ou d'autres cytokines activatrices inhiberait l'activation des Tconv pathogènes. Chez la souris NOD, un traitement par la cyclosporine A induit une rémission du diabète. Le premier essai clinique indique une réduction du besoin en insuline mais les effets secondaires sont importants (*Feutren et al., 1986*). Les essais suivants utilisant l'Azathioprine ou la Prednisone (inhibiteurs de la prolifération lymphocytaire) présentent des effets positifs sur le DT1 mais leur utilisation répétée induit de nombreux effets secondaires indésirables limitant leur utilisation (*Jenner et al., 1992*). (Tableau 5)

2b : L'ATG.

Une autre approche ciblant les LT est l'utilisation d'anticorps polyclonaux anti-LT et anti-thymocyte. Chez la souris NOD, l'administration d'ATG prévient le diabète et induit des Treg (*Simon et al., 2008*). Chez l'homme, l'administration d'ATG recombinante améliore la production du peptide C (*Saudek et al., 2004*). Cependant en phase II l'essai fut stoppé car le traitement induit une lymphopénie et un orage cytokinique important (*Monti et al., 2008*). Actuellement il est administré en combinaison avec la prednisone, un corticostéroïde utilisé pour contrecarrer le relargage cytokinique. Dans ce contexte, certains sujets présentaient une

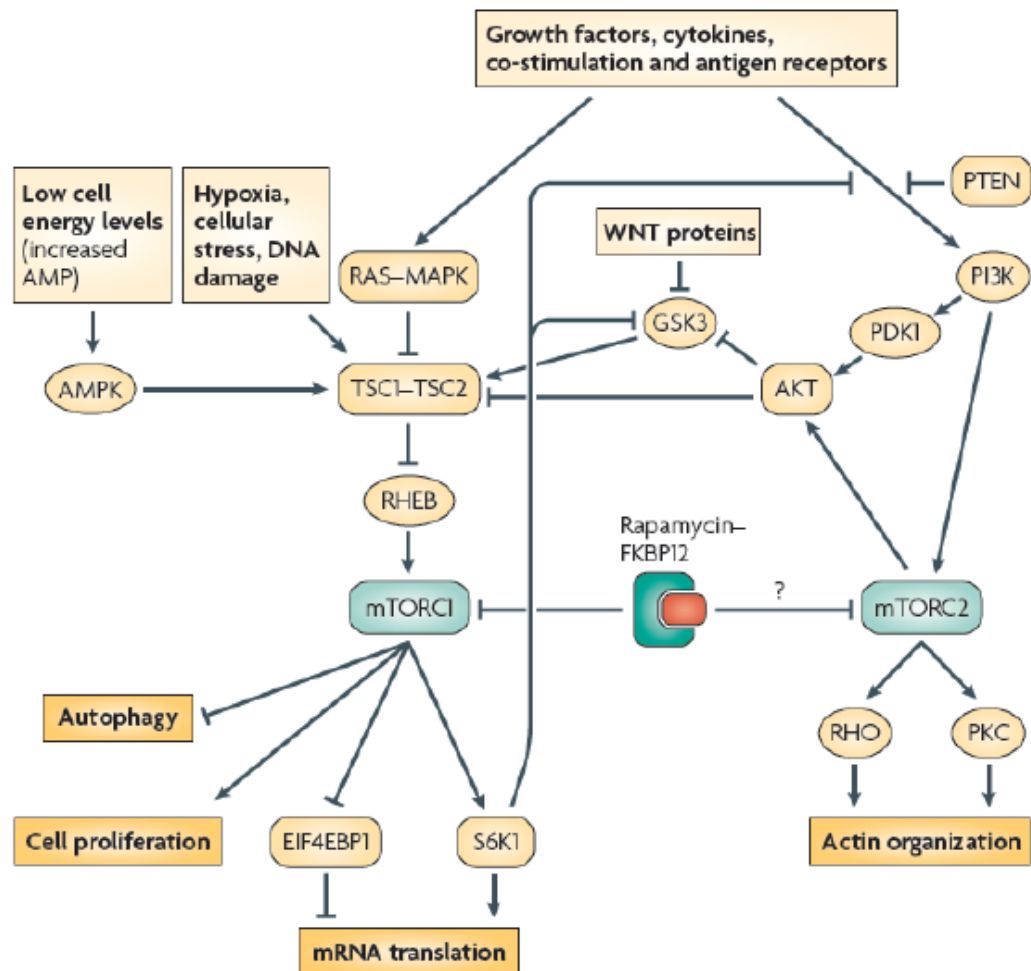


Figure 25. Voies de signalisations ciblées par la rapamycine. Issu de (Thomson et al., 2009).

rémission complète et sont devenus insulino-indépendants pendant près d'un mois. De plus, une autre étude a combiné le traitement par l'ATG avec l'anti-CD25 ou le G-CSF (granulocytes).

1c : considération immuno-thérapeutique : la rapamycine.

-Caractérisation.

Dans les années 1970 la rapamycine fut découverte à partir de prélèvements effectués sur l'île de Pâques (Rapa Nui). La rapamycine est un macrolide produit par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus*. Dans un premier temps cette molécule fut identifiée pour ces propriétés antifongiques (*Vezina et al., 1975*). Ce n'est que plus tard que l'on a découvert les propriétés immunosuppressives de la rapamycine. Le mécanisme de la rapamycine fait encore aujourd'hui l'objet d'investigations, bien qu'une serine/thréonine protéine kinase, "Mamalian Target Of Rapamycin" (mTOR), fut identifiée comme une cible centrale de cette molécule. Dans le système immunitaire, l'inhibition de mTOR par la rapamycine affecte la maturation des DC, inhibe la prolifération des Tconv et favorise l'induction des Treg.

-Mécanismes d'action de la rapamycine, la voie de signalisation mTOR.

Les études génétiques menées sur les bactéries *Saccharomyces cerevisiae* ont identifié deux gènes cible de la rapamycine, nommés TORC1 et TORC2 (*Heitman et al., 1991*). Un seul gène TORC nommé mTOR fut identifié chez les mammifères. Ce gène joue un rôle important dans le développement la protéine mTOR qui s'associe à d'autres molécules formant les complexes mTORC1 et mTORC2. La rapamycine inhibe les mTORC lorsqu'elle est associée à une immunophiline, la "FK506-Binding protein 1A" (FKBP12) (*Sehgal, 2003*). De façon notable, mTORC1 serait plus sensible à l'inhibition induite par la rapamycine que mTORC2. Les complexes mTOR sont activés par différentes voies : mTORC1 est activé par la voie RAS/MAPK, tandis que mTORC2 est activé par la voie PI3K/Akt. (**Figure 25**)

-Les cibles de la Rapa.

La rapamycine affecte de nombreux types cellulaires du système immunitaire ou non. Elle bloque la prolifération et l'activation des LB via le BCR ou CD40 (*Sakata et al., 1999*). Dans un modèle de greffe chez le rat, le traitement à la rapamycine induit une diminution de

la prolifération des NK mais n'altère pas leur fonction (*Gourlay et al., 1998*). D'autres travaux suggèrent que la rapamycine agit sur les neutrophiles ou les mastocytes (*de Paulis et al., 1991; Gomez-Cambronero, 2003*). Toutefois l'effet de la rapamycine a été décrit plus encore sur les Tconv et les DC. Dans les DC, la rapamycine va inhiber leur maturation en régulant l'expression de molécules de co-stimulation induites par les TLR ou par CD40 (*Turnquist et al., 2007*). La rapamycine peut aussi induire l'apoptose de ces cellules en inhibant le signal GM-CSF. Elle peut réguler les capacités migratoires des DC (*Reichardt et al., 2008*). Plusieurs travaux montrent le rôle différentiel de la rapamycine dans les Tconv et les Treg. Dans le thymus, l'administration de la rapamycine n'affecte pas le taux total de CD4⁺ SP mais augmente la proportion des Treg parmi ces LT CD4⁺ (*Coenen et al., 2007*). La rapamycine va inhiber la prolifération des Tconv mais aussi leur migration. Une étude récente a montré que sous l'effet de la rapamycine les Tconv ont une expression augmentée de CD62L et CCR7. Les Tconv vont se retrouver séquestrés dans le ganglion (*Sinclair et al., 2008*). A l'inverse, la rapamycine ne semble pas affecter l'homéostasie des Treg. *In vitro* des travaux ont même montré que la rapamycine n'affecte pas la fonction suppressive et la prolifération des Treg alors qu'elle bloque l'activation et la prolifération des Tconv (*Battaglia et al., 2006b*). *In vivo*, une administration prolongée de rapamycine induit une augmentation du nombre de Treg. Le fait que la rapamycine affecte moins les Treg par rapport aux Teff peut s'expliquer par une expression augmentée de PTEN, un inhibiteur de la Pi3K, dans les Treg (*Walsh et al., 2006; Zeiser et al., 2008*). Enfin, la rapamycine favorise l'induction des iTreg par le TGF- β en favorisant l'expression de Foxp3 (*Haxhinasto et al., 2008; Song et al., 2006*).

-L'effet thérapeutique de la rapa.

Actuellement, la rapamycine est utilisée en clinique principalement pour la prévention du rejet de greffe. Ainsi la rapamycine possède un effet bénéfique sur la prévention de la GvH chez l'homme (*Antin et al., 2003; Cutler et al., 2007*) et chez la souris (*Shin et al., 2011*). Dans le cadre du diabète, la rapamycine induit une diminution de l'apparition de la maladie chez les souris NOD (*Rabinovitch et al., 2002*). Cependant en combinaison avec l'anti-CD3 une étude a montré que la rapamycine peut inhiber la rémission induite par l'anti-CD3 (*Valle et al., 2009*).

2 : Autres biothérapies « plus récentes ».

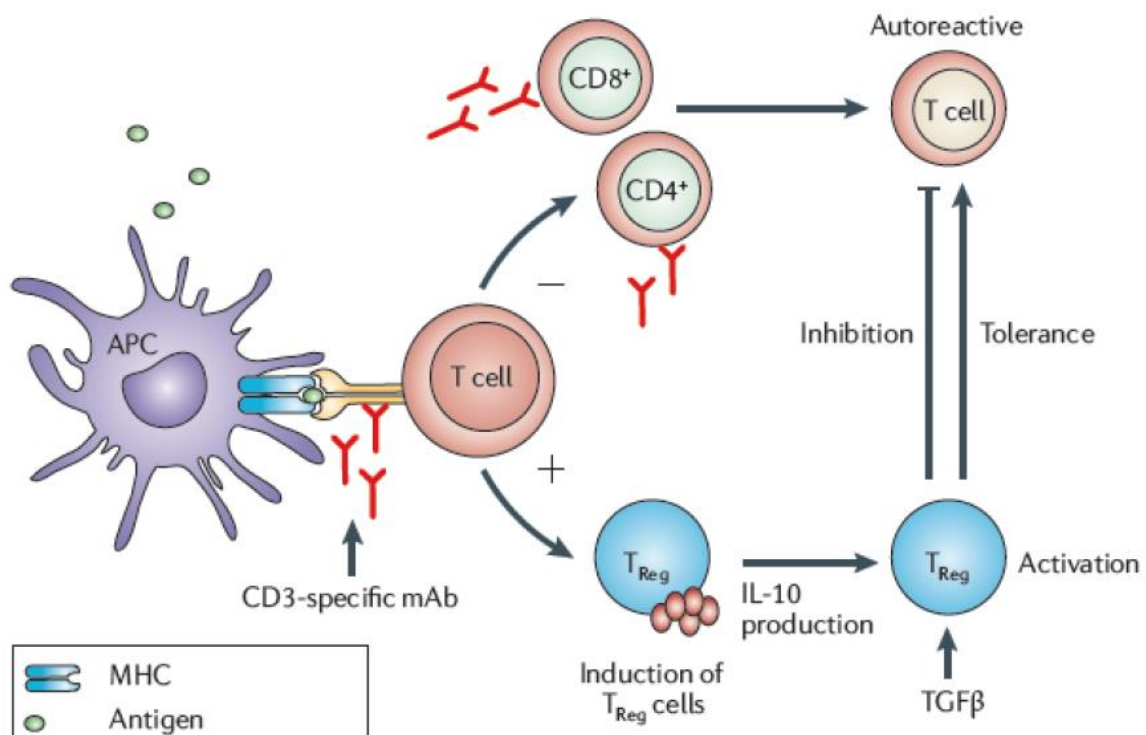


Figure 26. Proposition du mécanisme d'action de l'anti-CD3 teplizumab et oteplizumab. L'anti-CD3 agit en deux phases: initialement l'anti-CD3 induit une déplétion des LT pathogènes par anergie et apoptose, puis induit des Treg. Ces iTreg qui sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β vont inhiber les LT pathogènes. Adapté de (*Waldron-Lynch and Herold, 2011*).

2a : l'anti-CD3.

Un des traitements les plus prometteurs est probablement l'anti-CD3. Son rôle curatif fut décrit en premier chez la souris NOD (*Chatenoud et al., 1994*). En effet, chez la souris NOD, l'injection d'anti-CD3 pendant 5 jours consécutifs induit une rémission à long terme dans 60-80% des cas. L'anti-CD3 agit à différents niveaux. Il va induire une internalisation du TCR et provoquer une anergie ou une mort par apoptose des Tconv. Cette apoptose pourrait être aussi induite par la voie FAS/FAS-L. Ceci expliquerait pourquoi la mort induite par l'anti-CD3 touche particulièrement les LT activés exprimant FAS recrutés au site inflammatoire. Enfin, le traitement anti-CD3 induit aussi des Treg par l'intermédiaire du TGF- β (*Belghith et al., 2003; You et al., 2007*) (**Figure 26**). La complexité de ce traitement réside dans le choix de la dose à administrer. Si la dose est trop faible, elle ne pourra pas induire de Treg qui sont probablement les responsables de l'état de rémission au long terme. Inversement, une activation trop forte risque d'activer les Tconv et d'augmenter le relargage de cytokines pro-inflammatoires. Actuellement chez l'homme les essais cliniques avec l'anti-CD3 reposent sur deux types d'anticorps. Les deux sont complètement humanisés, de classe IgG, non mitogènes et spécifiques du CD3 humain. Les deux anticorps sont nommés, Teplizumab (hOKT3 γ 15) et l'Otelixizumab (chAgglyCD3) (*Bolt et al., 1993*) (*Xu et al., 2000*). Un essai de phase II a montré que le Teplizumab, stoppe la progression du DT1 pendant plus d'un an chez la plupart des patients (*Herold et al., 2002*). Un suivi sur 3 ans après le traitement indique un taux de peptide C préservé et l'utilisation de plus faibles doses d'insuline (*Herold et al., 2005*). Toutefois un essai clinique récent ne montre pas d'augmentation du taux de peptide C, ni de changement du taux d'HbA_{1c} entre le groupe placebo et le groupe traité (*Sherry et al., 2011*). L'autre anti-CD3, l'Otelixizumab, permet aussi une préservation des cellules β et diminue les besoins en insuline (*Keymeulen et al., 2005*). Cependant un effet secondaire fut constaté avec cet anticorps, à savoir l'apparition d'anticorps anti idiotypiques 2 à 3 semaines après traitement et une réactivation du virus Epstein-Barr. Il est important de noter que ces effets ne sont que transitoires et isolés (*Keymeulen et al., 2010*).

Malgré le fait que cette thérapie soit vraiment très prometteuse, aucun de ces essais n'ont permis de réguler l'hyperglycémie des patients sur la durée.

Habituellement, la voie d'administration de l'anti-CD3 est intraveineuse, or un autre type d'administration de l'anti-CD3 par voie orale est testé. Il a été montré dans un modèle

murin que l'administration de ce traitement induit une augmentation des Treg endogènes. Chez l'homme un essai de phase I montre que l'administration par voie orale de l'anti CD3 pendant 5 jours entraîne une diminution dans le sang périphérique des TH1/TH17, une augmentation de la production de TGF- β , d'IL-10 et une diminution de l'IL-23/IL-6 (*Ilan et al., 2010*).

2b : Le CTLA-4 Ig: abatacept et belatacept.

Comme décrit précédemment, le CTLA-4 est exprimé majoritairement par les Treg et les LT activés. Cette molécule de co-stimulation se fixe sur les récepteurs CD80/CD86 tout comme la molécule de co-stimulation CD28. Le CTLA-4 a un rôle suppresseur de la réponse immune. Le CTLA-4-Ig est une protéine de fusion comprenant le domaine extra-cellulaire de CTLA-4 et le domaine Fc de l'anticorps IgG1. Le rationnel du traitement par CTLA-4-Ig est d'inhiber l'activation des Tconv par le CD28 et d'induire leur anergie via la production d'IDO par les APC. Cependant le risque de cette stratégie est d'inhiber l'activation des Treg qui eux aussi ont besoin de co-stimulation par le CD28. Les résultats pré-cliniques menés chez la souris NOD sont divergents. L'administration de CTLA-4-Ig humain à des souris jeunes diminue l'apparition du DT1. A l'inverse l'incidence du diabète augmente avec l'utilisation de CTLA-4-Ig murin (*Salomon et al., 2000*). Chez l'homme, cette stratégie fut testée avec succès dans d'autres maladies auto-immunes telles que le psoriasis ou la polyarthrite rhumatoïde (*Abrams et al., 1999*). Actuellement testé dans le DT1, les premiers résultats indiquent que l'administration d'abatacept induit une diminution transitoire du taux de peptide C mais aurait plutôt un effet positif sur le « long terme ». Toutefois il est difficile d'évaluer l'effet thérapeutique de ce traitement car il ne permet pas de restaurer une tolérance immune et l'étude nécessite d'être poursuivie (*Orban et al., 2011*) D'autres essais avec le belatacept, un variant de l'abatacept, sont également en cours (*Cruzado et al., 2009*).

2c : L' anti-CD20, Rituximab.

Le rituximab contient un anticorps anti-CD20 utilisé dans d'autres maladies en particulier les lymphomes B. Le rituximab va éliminer les LB sans affecter les plasmocytes (*Hu et al., 2007*). Chez la souris NOD, les LB sont recrutés dans le pancréas. Actuellement en essai de phase II, les résultats préliminaires montrent une préservation du taux de peptide C (*Pescovitz et al., 2009*). Cet effet semble être plus important que celui obtenu avec l'anti-CD3.

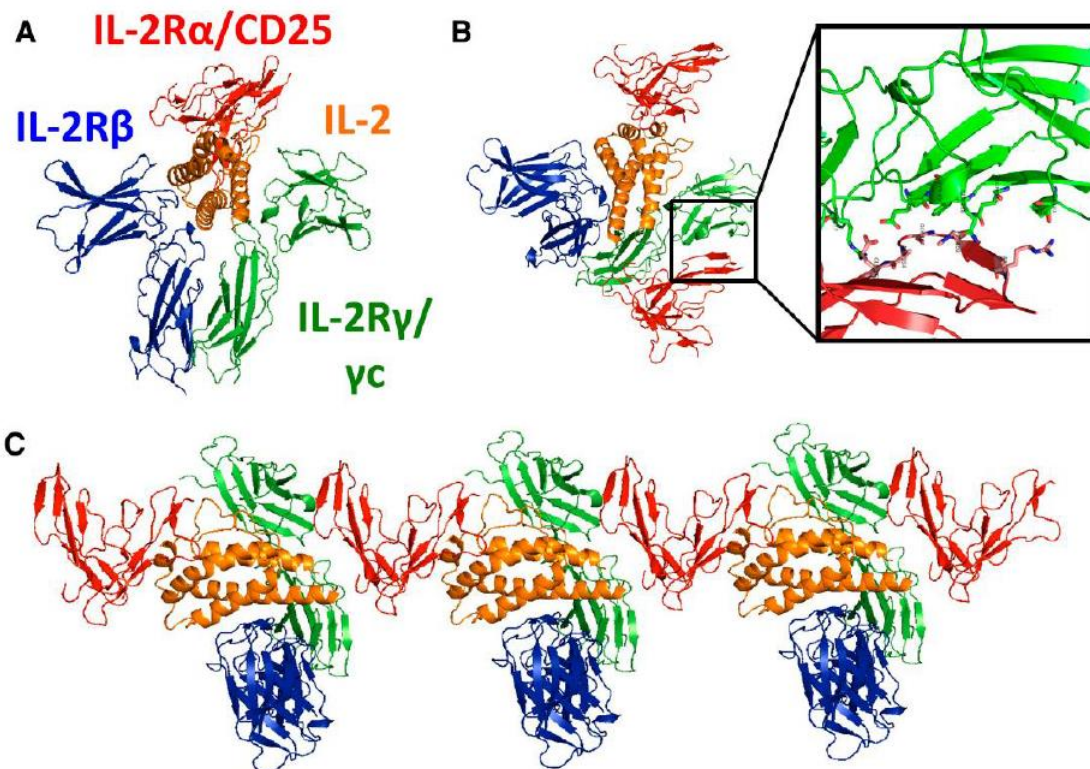


Figure 27. Récepteur à l'IL-2. Structure cristallographique du récepteur de l'IL-2. Celui-ci est constitué de 3 sous unités CD25, CD122, CD132. Ces récepteurs pourraient s'associer entre eux formant une chaîne de récepteurs à la membrane dans le but de stabiliser sa structure. Issu de (*Hulme et al., 2012*).

2d : Le ciblage de l'IL-1.

L'IL-1 recombinante, IL-1RA (l'anakinra, Kineret) ou le Canakinumab qui est un anticorps monoclonal anti-IL-1 humain sont utilisés dans le but de bloquer l'IL-1, une cytokine inflammatoire (*Dinarello, 2005*). Les travaux menés dans un modèle murin montrent une prévention du diabète (*Mandrup-Poulsen, 1996*). Actuellement en phase II, les premiers résultats ne montrent pas d'effet bénéfique sur la maladie (*Moran et al., 2013*). En revanche, chez la souris NOD la combinaison de l'IL-1 et de l'anti-CD3 a un effet curatif synergique.

2e : Le TNF- α .récepteur soluble.

Une autre cytokine ciblée est le TNF- α . Le TNF- α présente un rôle ambivalent chez la souris NOD. Il présente un effet bénéfique chez les souris âgées et néfaste chez les souris jeunes (*Jacob et al., 1990; Lee et al., 2005*). De plus il a été observé que le TNF- α a la capacité d'augmenter la prolifération des Treg (*Chen et al., 2007*). Toutefois le potentiel curatif du TNF- α est actuellement testé chez l'homme dans un essai de phase II, avec l'utilisation d'Etanercept (un TNF- α récepteur soluble). Les premiers résultats avec l'Etanercept montrent une diminution des HbA_{1C} et une augmentation de la production d'insuline (**Tableau 5**).

2f : considération thérapeutique de L'IL-2.-Caractérisation.

En 1965, J Gordon et J MacLean LD ont découvert dans le milieu de culture de leucocytes activés une molécule soluble responsable de leur prolifération : l'IL-2 (*Gordon and MacLean, 1965*). Cette découverte a été la première identification d'une molécule soluble produite par les cellules du système immunitaire. Cette interleukine possède différents rôles sur le système immunitaire : par exemple l'IL-2 active les lymphocytes T, favorise la dégranulation des éosinophiles, active les NK, et peut avoir un effet stimulateur des LB (*Lin and Hunig, 2003*). Mais avant tout cette cytokine est essentielle à l'homéostasie des Treg.

-Les récepteurs de l'IL-2.

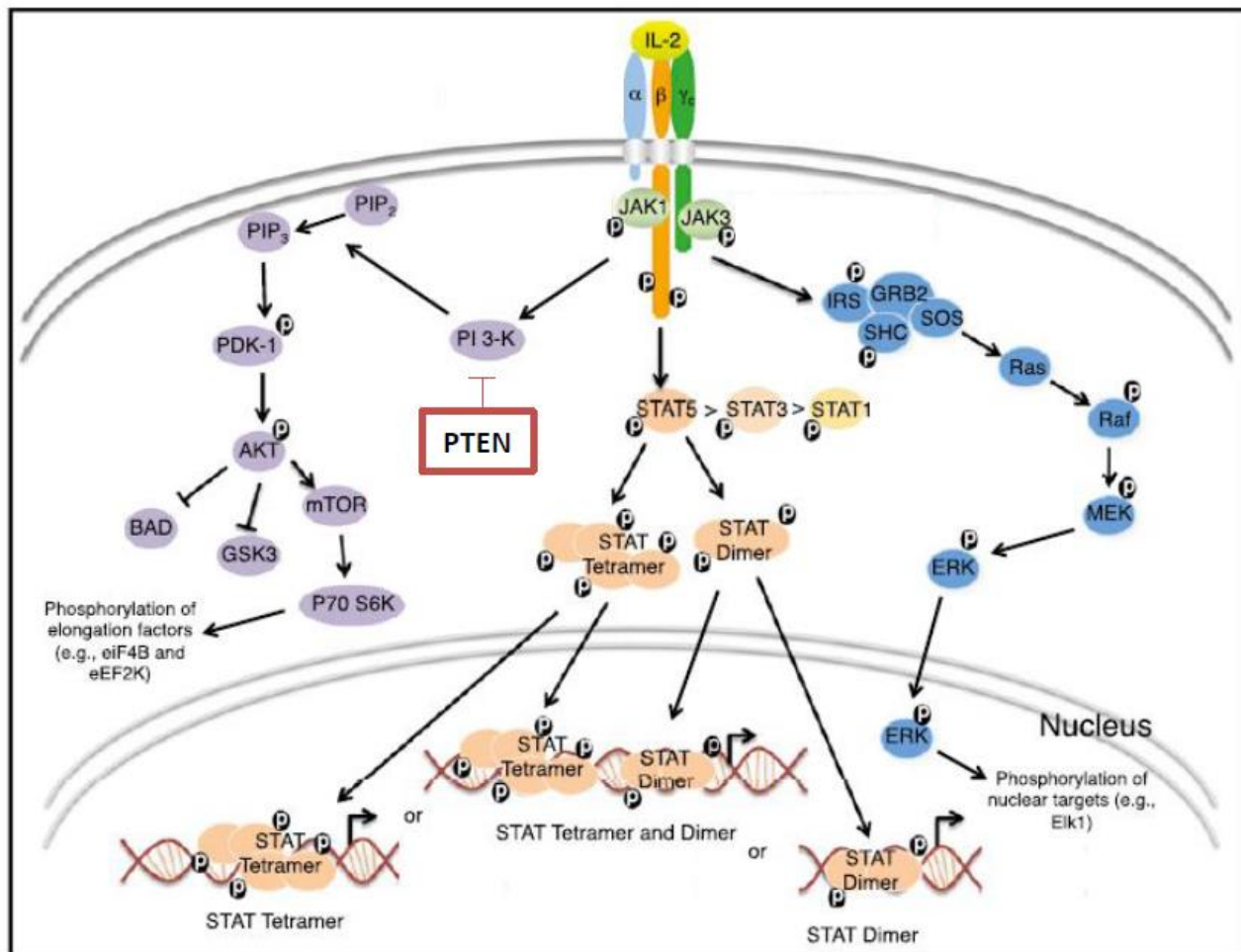


Figure 28. Schéma simplifié des voies de signalisation induites par l'IL-2. L'IL-2 dans les Tconv active la voie Pi3K/ AKT, STAT5. Dans les Treg l'IL-2 va activer la voie STAT5 car à la périphérie les Treg expriment plus fortement la molécule PTEN qui est un inhibiteur de la voie Pi3K. Issu de (*Lin and Hunig, 2003*).

Comme décrit précédemment, l'IL-2 appartient à la famille des cytokines γ C. Ainsi le récepteur de l'IL-2 présente 3 sous unités : l'IL-2R- α (CD25), l'IL-2R- β , (CD122), l'IL-2R- γ (CD132) (**Figure 27**). Les NK et les Tconv expriment majoritairement le récepteur d'affinité intermédiaire constitué des chaînes CD122 et le CD132, alors que les Treg, qui expriment de façon constitutive le CD25, présentent à leur surface le récepteur de haute affinité, constitué des 3 chaînes (CD25, CD122 et CD132) (*Malek and Castro, 2010*). Des études de microscopie ont montré que les récepteurs à l'IL-2 ne sont pas répartis de façon homogène à la membrane, mais sont regroupés autour de la synapse immunologique (*Doh and Krummel, 2010*). De plus, l'étude de la structure cristallographique suggère que l'IL-2 se fixe en premier au CD25 puis au CD122 et enfin au CD132 (*Stauber et al., 2006*) (**Figure 27**). Les chaînes CD122 et CD132 du récepteur à l'IL-2, peuvent se fixer à l'IL-2 ou à l'IL-15, ces deux interleukines peuvent ainsi entrer potentiellement en compétition. Des études utilisant la microscopie confocale ont identifié que le CD25 et l'IL-15R- α sont exprimés à la membrane dans le même micro-domaine (*Vamosi et al., 2004*). De plus, une étude récente a montré aussi que l'IL-15 complexée aux CD122 et CD132 présente une structure tertiaire très similaire de celle de l'IL-2 complexée aux CD25, CD122 et CD132. Il semble que l'assemblage du récepteur à l'IL-15 dépend de la présence de l'IL-15R- α qui permet une meilleure fixation au CD122. Il y aurait une activation en *trans* de l'IL-15R. De plus *in vitro* à concentration saturante les signaux transduits par l'IL-15 et l'IL-2 sont similaires (*Ring et al., 2012*). L'hypothèse serait que toutes les sous-unités des différents récepteurs de la famille γ C sont exprimées à proximité du CD132. Ceci permettrait un assemblage rapide lorsque la cytokine se présente (*Damjanovich et al., 1997*). Une étude suggère que le récepteur de l'IL-2 de forte affinité, une fois constitué, peut se connecter à son homologue voisin créant ainsi un complexe de récepteurs. Cette formation peut avoir comme effet une meilleure stabilisation des récepteurs de l'IL-2 et une augmentation de leur signal (*Damjanovich et al., 1997; Wang et al., 2005*). Inversement, le relargage par les LT d'une forme soluble de CD25 va inhiber le signal IL-2.

Dans leur ensemble ces travaux montrent que la structure même du récepteur influence la capacité de réponse à l'IL-2.

-Le signal transduit par l'IL-2.

Les Treg et les Tconv vont répondre de différentes manières à l'induction du signal à l'IL-2. Sous IL-2, différentes voies de signalisations vont être activées. Dans un premier

Rx age	Formulation/dose	Frequency	Rx duration	Concurrent Rx/dose	Rx group %euglycemic (success/total)	Control group %euglycemic (success/total)
5 wk	RM/0.5 μ g	Daily	15 wk	N/A	80% (8/10)	56% (5/9)
10 wk	RM/0.5 μ g	Daily	10 wk	α -IL-2 mAb/5 μ g	95% (18/19)	39% (7/18)
10 wk	RH/5 μ g	Daily	5 d	α -IL-2 mAb/50 μ g	20% (2/10) [‡]	100% (10/10)
10 wk	RH/4 ng	Daily	15 wk	N/A	0% (0/9)	0% (0/9)
10 wk	RH/4 ng	Daily	15 wk	Rapa/0.1 mg/kg	67% (6/9)	0% (0/9)
10 wk	RH/4 ng	Daily	15 wk	Rapa/1 mg/kg	78% (7/9)	0% (0/9)
6 wk	RH/250 IU	2 \times wkly	14 wk	N/A	50% (6/12)	0% (0/12)
6 wk	RH/250 IU	2 \times wkly	14 wk	Poly I:C/50 μ g	80% (10/12)	0% (0/12)
10 wk	AAV.II-2/inducible	Once [§]	3 wk	Dox/200 mg/kg	73% (11/15)	10% (1/10)
10 wk	AAV.II-2/inducible	Once [§]	3 wk	AAV.TGF- β /inducible Dox/200 mg/kg	60% (3/5)	10% (1/10)

Tableau 6. Liste non exhaustive des différents traitements par l'IL-2 chez la souris NOD. Issu de (Hulme et al., 2012).

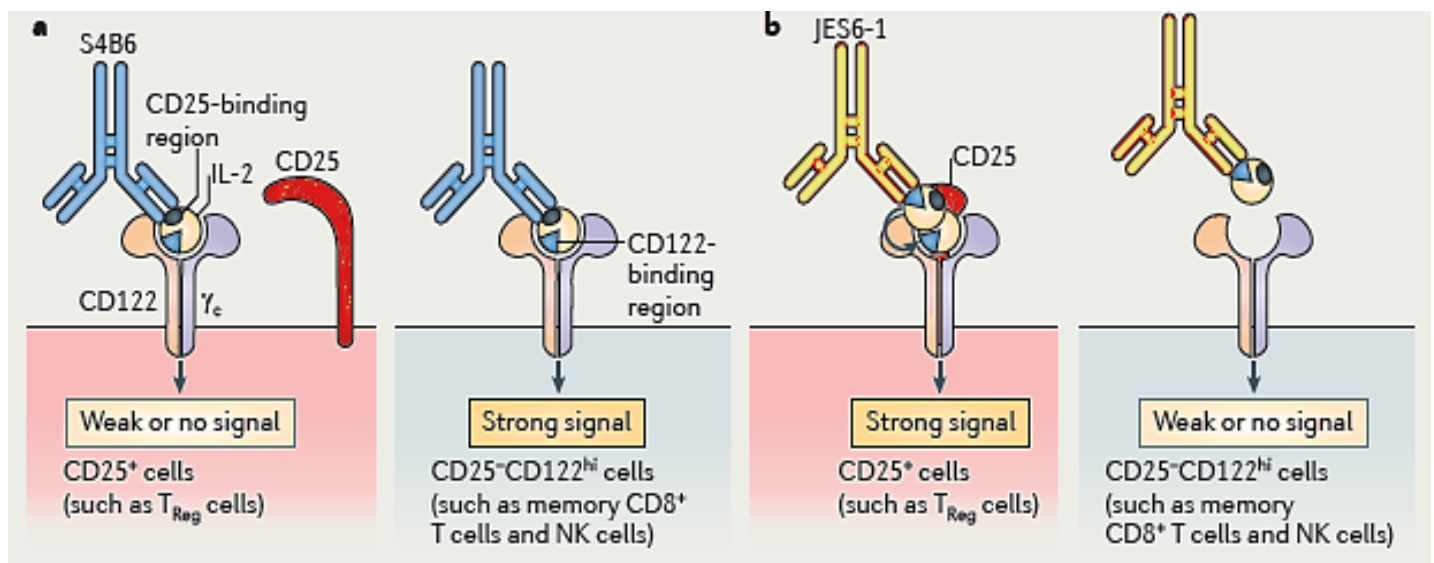


Figure 29. Fonctionnement des différents IL-2 complexes, chez la souris. (a) représentation du mode d'action du complexe IL-2/S4B6 qui favorise les NK et les Tconv. (b) IL-2/JES6-1 qui lui stimule préférentiellement les Treg. Issu de (Boyman and Sprent, 2012).

temps les tyrosines kinases JAK-1/3 vont être phosphorylées, conduisant à l'activation de la voie STAT5, PI3K/AKT ou ERK. La voie STAT5 dans les Treg va favoriser l'expression de Foxp3. Les Treg expriment la protéine PTEN qui va réprimer la voie PI3K/AKT. Dans les Tconv, le signal induit par l'IL-2 va entraîner l'expression de CD25 mais aussi de l'IL-2 elle-même. (**Figure 28**)

-L'effet thérapeutique de l'IL-2 (**Figure 30**)

Chez la souris, l'IL-2 permet la prévention du DT1 en favorisant la survie et la fonction suppressive des Treg (*Tang et al., 2008*). Toutefois, l'effet bénéfique de l'IL-2 dépend principalement de la dose administrée et de la formulation (**Tableau 6**). En effet plusieurs formulations visant à améliorer l'effet de l'IL-2 ont été testées, par exemple une IL-2 trimérique construite dans le but de majorer son efficacité. Cette IL-2 présente une affinité 3000 fois plus élevée que l'IL-2 normale et semble favoriser préférentiellement les Treg (*Margolin et al., 2007*).

Afin d'augmenter sa demi-vie, l'IL-2 a été complexé avec un anticorps anti IL-2. Il existe différentes formes d'IL-2 complexée, permettant de cibler préférentiellement soit les Treg soit les Tconv et les NK. Dans le but de favoriser l'activation des Tconv et des NK, l'IL-2 va être complexée avec un anticorps reconnaissant la partie CD25 qui est plus fortement exprimée par les Treg. Ainsi, ce complexe murin nommé IL-2-S4B6 va pouvoir se fixer sur le CD122 et le CD132 des récepteurs de la famille γ C mais pas ou peu sur le CD25 (*Letourneau et al., 2010*) (**Figure 29**). L'injection d'IL-2-S4B6, permettant de stimuler les Tconv et les NK, entraîne une diminution de la croissance tumorale (*Tomala et al., 2009*) et permet de favoriser les réponses antivirales (*Hamilton et al., 2010*). L'IL-2-JES6-1 est un autre complexe créé dans le but de favoriser les Treg. Ce complexe est composé d'un anticorps qui reconnaît la partie de l'IL-2 se fixant sur le CD122 et l'IL-2 (**Figure 29**). Cette stratégie permet de favoriser l'induction de signal IL-2 sur les Treg sans pour autant stimuler les Tconv et les NK. L'administration de ce traitement induit ainsi une très forte augmentation des Treg et prévient le diabète (*Boyman et al., 2006; Tang et al., 2008*).

Chez l'homme, l'IL-2 a été utilisée préalablement dans d'autres maladies que le diabète. Dans un premier temps, l'IL-2 à forte dose a été utilisée dans certains cancers (*Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006; de Vries et al., 2011*) ou chez les patients infectés par le HIV (*Abrams et al., 2009*). Les résultats de ces études sont assez mitigés car pour la plupart ils montrent une

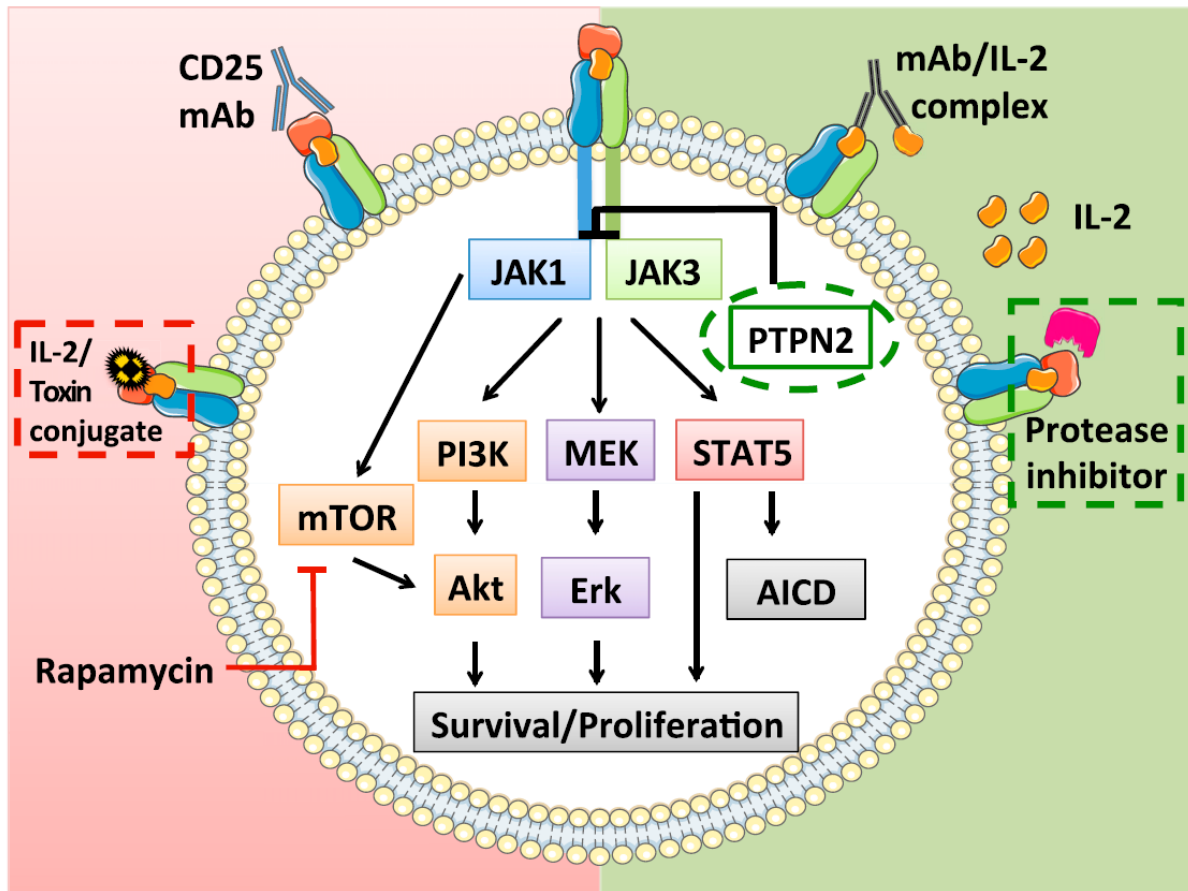


Figure 30. Représentation des cibles thérapeutiques de la voie de l'IL-2. Les cibles thérapeutiques favorisant l'engagement de la voie de signalisation sont entourées en vert, et celles l'inhibant en rouge, les cibles entourées n'ont pas été testées chez l'homme. Issu de (Hulme et al., 2012).

activation des Tconv mais aussi des Treg. A faible dose, l'IL-2 a été testée dans le but de stimuler les Treg soit chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C (HCV) associés à des vascularites, soit dans le but de prévenir la GvHD (*Koreth et al., 2011; Saadoun et al., 2011*). Pour les patients atteints de vascularite, cette étude montre une amélioration des symptômes dans 8 cas sur 10, accompagnée d'une augmentation du taux des Treg. De plus l'analyse du transcriptome des cellules mononuclées du sang révèle une diminution de l'inflammation (*Saadoun et al., 2011*). Concernant la prévention de la GvHD, une étude montre que des patients transplantés avec des cellules souches hématopoïétiques (CSH) puis traités à l'IL-2, présentent une augmentation du pourcentage des Treg (*Koreth et al., 2011*). Enfin, un essai clinique récent basé sur l'administration quotidienne de faibles doses d'IL-2 (3×10^5 à $1,5 \times 10^6$ UI) pendant 12 semaines montre une augmentation du taux de Treg, une amélioration de leur fonction suppressive et une amélioration des signes cliniques (*Matsuoka et al., 2013*).

L'ensemble de ces études suggère que l'IL-2 pourrait avoir un effet bénéfique chez les patients atteints de DT1. D'ailleurs deux essais cliniques sont actuellement en cours.

De façon notable, un essai clinique récent a consisté à combiner l'administration d'IL-2 et de rapamycine chez des patients DT1 (*Long et al., 2012*). Cette stratégie visait à favoriser les Treg par l'administration d'IL-2 combinée au pouvoir immunosuppresseur de la rapamycine touchant préférentiellement les Tconv. Cependant les résultats obtenus sont négatifs et l'essai a dû être arrêté. Cet essai sera abordé de façon plus détaillée dans la discussion de ce mémoire.

C : Les thérapies basées sur le transfert de cellules.

1 : Cellules souches hématopoïétiques.

D'autres thérapies ciblent les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH peuvent être facilement isolées à partir de la moelle osseuse ou de sang de cordon ombilical. Ces cellules peuvent aussi être collectées à partir de sang périphérique (*DiPersio, 2011*). L'utilisation des CSH a pour but de restaurer un état de tolérance au soi après une lympho-ablation transitoire pour éliminer les cellules pathogènes suivie d'une auto-greffe de ces cellules (*Milanetti et al., 2010*). Cette stratégie permettrait aux CSH d'induire une régénération du système immunitaire visant à faire disparaître l'auto-immunité. Pour que cette stratégie lourde soit efficace il faut que les îlots pancréatiques soient dans le meilleur état possible.

Ainsi les jeunes adultes nouvellement diagnostiqués seraient privilégiés pour ce type de traitement. Les premiers résultats de cette étude montrent que la majorité des patients auto-greffés présentent un sevrage de l'insulinothérapie pendant plus de deux ans (*Snarski et al., 2011*). Il reste le risque de mort induit en conditionnant les patients avant greffe. D'autre part, il a été observé une oligospermie chez les patients traités ; ce phénomène est à prendre en considération dans le cas où l'on traiterait de jeunes enfants (*Voltarelli and Couri, 2009*).

2 : Transfert de cellules immunocompétentes.

Un essai clinique de phase I/II est mené actuellement avec différentes quantités de Treg polyclonaux injectés à des patients nouvellements diabétiques. Il semble qu'il n'y ait pas d'effet secondaire mais aucune efficacité (NCT01210664). Ceci était attendu dans la mesure où dans un modèle NOD, l'administration de Treg BDC 2.5 mais pas de Treg polyclonaux induit une rémission de la maladie (*Tang et al., 2004b*). Une stratégie possible, serait d'isoler les Treg spécifiques d'antigènes pancréatiques issus de patients diabétiques et de les expandre. Toutefois, cette technique lourde et coûteuse nécessite d'être développée en condition de grade clinique. De plus certaines questions restent en suspens. A savoir : le risque de contamination de la préparation par des Tconv hautement pathogènes ; la quantité de Treg à injecter aux patients, la répartition de ces Treg une fois transférés et le risque de transformation de ces Treg en Tconv pathogènes.

D'autres stratégies de thérapies cellulaires ciblent les cellules dendritiques tolérogènes. Nous avons abordé précédemment comment les DC peuvent favoriser les Treg. De plus une étude a montré que le transfert de DC tolérogènes permet de prévenir le diabète (*Machen et al., 2004*). Une autre approche serait de favoriser les tDC directement *in vivo*. Il a été démontré que l'administration de G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) favorise l'induction des tDC (*Rutella et al., 2004*) et des Treg (*Kared et al., 2005*). Chez la souris NOD, le G-CSF permet la prévention du DT1. Un essai de phase I/II est actuellement en cours chez l'homme ; les premiers résultats indiquent que le taux de peptide C est préservé chez les patients traités.

RESULTATS

Première partie : Induction du “ boost ” des Treg par les Tconv.

Article 1*.

Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs

Yenkel Grinberg-Bleyer*, David Saadoun*, Audrey Baeyens, Fabienne Billiard, Jérémie D. Goldstein, Sylvie Gregoire, Gaëlle H. Martin, Rima Elhage, Nicolas Derian, Wassila Carpentier, Gilles Marodon, David Klatzmann, Eliane Piaggio et Benoît L. Salomon. *J Clin Invest* (2010) ; 120 :4558.

* : co-premiers auteurs.

Article 2.

Characterization of the boost of regulatory T cell activation by effector Tcells

Audrey Baeyens*, David Saadoun*, Fabienne Billiard, Sylvie Gregoire, Yenkel Grinberg, Eliane Piaggio and Benoît L. Salomon

Article en préparation, pour soumission.

* : co-premiers auteurs.

I : Contexte du projet I.

Cette première partie des résultats demontre que les Tconv ont la capacité d’induire une activation des Treg. Cette activation se manifeste par une augmentation de la prolifération, de l’expansion et du pouvoir supresseur des Treg.

Dans un contexte inflammatoire, le dommage tissulaire induit un accroissement de la présentation d’auto-antigènes ainsi qu’une propagation de cytokines inflammatoires et de chimiokines. Ceci peut mener à l’activation de LT auto-réactifs par effet “ bystander ”, conduisant potentiellement à l’auto-immunité. Les Tconv activés peuvent directement rétro-contrôler ce processus par l’intermédiaire de nombreux facteurs, par exemple : les Tconv pathogènes fortement activés peuvent produire de l’IL-10 (*Gabrysova et al., 2009*) ; les Tconv, en sécrétant de l’IFN- γ , favorisent aussi la production d’IDO (*Cuffy et al., 2007*). Cependant les Treg sont les acteurs essentiels du contrôle de l’inflammation et de l’auto-immunité. De nombreuses études observent une hausse des Treg dans le site inflammatoire ou

* : j’ai ajouté aux résultats, le premier article portant sur la description du boost Tconv→Treg dans un contexte auto-immun. Je ne suis pas première auteur dans cet article mais il correspond à mes travaux de première année de thèse et il m’a permis de poser les bases au second article.

dans les ganglions drainants (*Tang et al., 2008*). Les facteurs responsables de cette augmentation sont probablement nombreux et variés. Nous avons mis en évidence l'un d'entre eux, à savoir l'impact de la présence des Tconv activés sur les Treg. Nous avons constaté la présence de ce rétrocontrôle dans deux contextes différents : (i) dans un contexte de diabète auto-immun, où les LT sont activés dans le pancréas et les ganglions drainants, (ii) dans un contexte fortement inflammatoire induit par du CFA, où les LT spécifiques d'un antigène exogène vont s'activer dans le ganglion drainant le site d'immunisation.

II : Description succincte des modèles utilisés :

A : Le modèle insHA.

Ce modèle murin de fond génétique BALB/C exprime une protéine d'enveloppe du virus Influenza, l'hémagglutinine (nommée HA), sous le contrôle du promoteur de l'insuline RIP (Rat Insuline Promotor). Par conséquent HA est exprimée spécifiquement dans les cellules β du pancréas (et le thymus).

B : Les souris TCR transgéniques.

Afin de mettre en évidence un effet "bystander" et d'avoir une activation simultanée des Treg et des Teff, nous avons utilisé deux modèles de souris de fond Balb/c exprimant un TCR transgénique spécifique de deux épitopes différents de HA : HA₁₁₁₋₁₁₉, (SFE) et HA₁₂₆₋₁₃₈, (HNT). D'autres modèles de DT1 ont été utilisés, la souris NOD (CF introduction troisième partie I C) et les souris NOD BDC 2.5 qui possèdent un TCR transgénique spécifique d'un antigène pancréatique, la chromogranine A (*Stadinski et al., 2010*).

III : Le boost des Treg dans l'autoimmunité.

A Description du boost des Treg induit par les Tconv pathogènes dans le DT1.

Dans un contexte auto-immun, les Tconv diabétogènes activés induisent l'activation et la prolifération des Treg. Ces travaux mettent en évidence pour la première fois un nouveau mécanisme de rétrocontrôle des Tconv auto-réactifs. En effet, dans les deux modèles de diabète utilisés (insHA et NOD), lorsque des Treg spécifiques d'antigènes pancréatiques transférés seuls rencontrent leur antigène spécifique, ils prolifèrent peu. En revanche, le co-transfert de ces Treg avec des Tconv activés de même spécificité induit une forte prolifération et expansion des Treg. Cette expansion des Treg est d'un facteur 10 à 20 et

se manifeste principalement dans le ganglion pancréatique et le pancréas où leur antigène spécifique est présent (**art 1 Figure 1-3**). Ces Treg présentent un phénotype activé puisqu'ils expriment plus fortement le CTLA-4, ICOS et CD44 (**art. Figure 1**). De plus, le transfert de Tconv BDC 2.5 à des souris NOD pré-diabétiques, âgées de 4 à 7 semaines, induit une hausse de la prolifération et de la proportion des Treg endogènes infiltrant le pancréas (**art 1 Figure 4**). Nous avons appelé ce phénomène : « boost Tconv → Treg ».

B : Le rôle protecteur des Tconv diabétogènes.

Dans le but d'explorer le rôle physiopathologique de ce « boost » des Treg, nous avons utilisé le modèle insHA. Le transfert de Tconv activés spécifiques de HA aux souris insHA induit un diabète en deux semaines dans environ 95% des cas. Lorsque ces souris sont co-transférées avec des Tconv et des Treg de mêmes spécificités, elles ne développent pas de diabète, probablement à cause de l'effet « boost » des Tconv sur les Treg. Afin de confirmer le rôle protecteur de ce « boost » des Treg, des Tconv pathogènes ont été réinjectés 3 semaines après le premier transfert de LT. La plupart des souris possédant préalablement des Treg « boostés » sont protégées de la maladie. L'ensemble de ces travaux montre que le « boost Tconv → Treg » permet de prévenir la maladie (**art 1 Figure 2**).

C : Etude du mécanisme du « Tconv → Treg boost ».

1 : D'un point de vue cellulaire.

Les cellules dendritiques ont un rôle essentiel dans l'homéostasie des Treg et ce particulièrement dans un contexte inflammatoire. Pour ces raisons, des souris insHA transférées avec des Treg seuls ou avec des Tconv ont été traitées avec un anticorps bloquant spécifiquement les pDC (anti-PDCA1). Nous avons observé que l'inhibition des pDC induit une diminution de la prolifération et de l'expansion des Treg « boostés » par les Tconv (**art 2 Figure 1**). Ces données indiquent que le « boost Tconv → Treg » dans un contexte auto-immun nécessite l'intervention d'un troisième facteur, les pDC.

2 : D'un point de vue moléculaire.

Le rôle potentiel dans le boost de plusieurs facteurs qui participent à l'homéostasie des Treg a été évalué, comme par exemple l'IL-2 (CF introduction deuxième partie III A, 1a). Toutefois, les Tconv issus de souris IL-2^{+/+} ou IL-2^{-/-} présentent la même capacité à induire

une augmentation de la prolifération et l'expansion des Treg. De plus l'activation de la voie de signalisation de l'IL-2 dans les Treg est inchangée par l'ajout des Tconv (**art 1 Figure 5**).

D'autre part, l'analyse des transcrits issus des Treg "boostés" montrent que la voie de signalisation du TNF- α est fortement activée (**art1 Figure 6**). Par conséquent nous avons testé le rôle de cette molécule dans le "boost Tconv→Treg" en utilisant un récepteur soluble au TNF- α ou un anticorps bloquant le TNF- α . *In vivo*, en présence d'un inhibiteur de la voie du TNF- α , l'augmentation de la prolifération et de l'expansion des Treg induite par les Tconv est partiellement diminuée (**art 1Figure 7**).

De plus la voie de signalisation du TNF- α est complexe et peut être activée par plusieurs facteurs de la TNFRSF (CF.introduction deuxième partie II D). Nous avons donc testé d'autres facteurs de la famille du TNF tel OX40. Pour cela nous avons utilisé un anticorps bloquant OX40-L qui est exprimé sur les APC. Dans le modèle insHA, l'administration d'un anticorps bloquant anti-OX40-L induit aussi une inhibition partielle du "boost" des Treg (**art2 Figure 2**). En revanche, l'inhibition simultanée de ces 2 facteurs TNF- α et OX40-L n'a pas d'effet complémentaire sur le "boost Tconv→Treg" (**art 2 Figure sup 3**).

L'ensemble de ces résultats indiquent que d'un point de vue moléculaire le "boost Tconv→Treg" est dépendant à la fois du TNF- α et de OX40, mais qu'il existe un autre facteur mis en jeu.

IV : Le "boost" des Tconv→Treg, dans un contexte de forte inflammation.

A : Les Tconv activés favorisent l'expansion des Treg chez la souris BALB/C immunisée en CFA.

Pour pouvoir caractériser ce phénomène chez la souris BALB/C, nous avons transféré, à des souris Balb/c, des Treg issus de souris transgéniques TCR spécifiques de HA₁₂₆ (Treg HA₁₂₆) en présence ou non de Tconv isolés de souris transgéniques TCR spécifiques de HA₁₂₆ ou HA₁₁₁ (Tconv HA₁₂₆ ou HA₁₁₁). Après injection, ces souris ont été immunisées dans la patte avec les peptides cognitifs des LT transférés émulsifiés en CFA. Quatre jours après l'immunisation les Treg transférés seuls prolifèrent peu, tandis que les Treg co-transférés avec les Tconv prolifèrent plus fortement et le nombre absolu de Treg divisés augmente d'un facteur 3,5 dans le ganglion drainant le site d'immunisation (**art2 Figure 3, 4**). Notons

cependant que dans ce contexte inflammatoire le “boost Tconv→Treg” est moins élevé en comparaison avec les modèles d’auto-immunité (facteur 10 à 20). De plus nos résultats montrent que l’activation des Tconv est nécessaire au “boost” des Treg, puisque le co-transfert de Tconv polyclonaux de souris BALB/C avec des Treg HA₁₂₆ n’induit pas d’accroissement de la prolifération des Treg. Des résultats similaires ont été obtenus en présence de Treg polyclonaux issu de souris BALB/C co-transférés avec des Tconv HA₁₂₆. Inversement, lorsque les Treg sont transférés seuls, ils prolifèrent trop fortement, pour être “boostés” par les Tconv transférés (**art2 Figure 4**). Enfin, dans une dernière expérience nous avons co-transféré des Treg HA₁₂₆ et des Tconv HA₁₁₁ à des souris Balb/c immunisées dans la patte droite par une émulsion HA₁₂₆-CFA et dans la patte gauche par HA₁₁₁-CFA. Dans cette expérience les Tconv et les Treg sont activés respectivement à distance. De façon remarquable nous n’observons pas de “boost” de Treg dans les ganglions poplités drainants le site d’immunisation mais plutôt à distance dans le ganglion inguinal (**art 2 Figure 5**).

B : L’IL-2 est indispensable au « boost Tconv →Treg » chez la souris Balb/c.

1 : D’un point de vue cellulaire.

Ayant observé que le “boost Tconv→Treg” était dépendant des pDC dans nos modèles de diabète, nous avons testé son rôle chez la souris BALB/C. Les résultats obtenus montrent que la prolifération des Treg ainsi que le nombre absolu de Treg divisés tend à diminuer mais de façon non significative dans le ganglion drainant (**art 2 Figure 6**). Ceci suggère que dans ce contexte les pDC n’ont qu’un rôle secondaire dans le “boost Tconv →Treg”.

2 : D’un point de vue moléculaire.

L’immunisation par le CFA induit une forte activation des Tconv et une forte production de TNF- α . Sachant que cette molécule était responsable du “boost Tconv →Treg” dans un contexte auto-immun, nous avons testé son implication chez la souris Balb/c. Comme précédemment, l’inhibition du TNF- α par un récepteur soluble ou par un anticorps anti- TNF- α inhibe de façon partielle le “boost Tconv →Treg” (**art2 Figure 7**). De façon surprenante nous avons constaté que dans une situation auto-immune le “boost” des Treg était indépendant de l’IL-2. Cette observation nous a conduits à vérifier si c’était toujours le cas

dans un contexte différent. Ainsi des souris Balb/c ont reçu des Treg HA₁₂₆ seuls ou avec des Tconv HA₁₁₁ IL-2^{+/+} ou IL-2^{-/-}. Les Treg HA₁₂₆ transférés seuls présentent presque la même expansion que ceux co-transférés avec les Tconv IL-2^{-/-}. Ces données montrent que le “boost Tconv→Treg” dans des conditions de forte inflammation est dépendant de l’IL-2 lorsque les LT reconnaissent un antigène exogène (**art 2 Figure 8**).

L’ensemble de ces données a permis de mettre en évidence l’existence de deux types de “boost Tconv →Treg”. Le premier, de forte amplitude et présent dans un contexte auto-immun, dépend fortement des pDC, du TNF- α et d’OX40 mais il est indépendant de l’IL-2. Le deuxième, de moins forte amplitude et présent dans un contexte fortement inflammatoire dirigé contre des antigènes exogènes, dépend principalement de l’IL-2 mais aussi du TNF- α .

Deuxième partie : L'effet Curatif de L'IL-2 seul ou combiné avec la rapamycine chez la souris NOD

I : Contexte du projet II.

L'IL-2, majoritairement produite par les Tconv est un facteur clé de l'homéostasie des Treg. Les souris NOD, comme les patients atteints de DT1, présentent un déficit génétique dans la production d'IL-2 (CF. Introduction troisième partie B 1). De plus, un travail antérieur de notre équipe a montré que l'administration d'IL-2 exogène permet la prévention du diabète (*Tang et al., 2008*). Pour ces raisons nous avons étudié le pouvoir curatif de l'IL-2 chez la souris NOD.

Article 3 :

IL-2 reverse established type1 diabetes in NOD mice by local effect on pancreatic regulatory Tcells.

Grinberg-Bleyer Y*, Baeyens A* ; You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, Cagnard N, Carpentier W, Tang Q, Bluestone J, Chatenoud L, Klatzmann D, Salomon BL, Piaggio E. *J exp Med* (2010) 207:1871.

* : co-premiers auteurs.

A : L'IL-2 induit une rémission du diabète à long terme.

Nous avons traité des souris nouvellement diabétiques c'est-à-dire présentant une hyperglycémie située entre 250 et 350 ng/dl, avec 25000 UI d'IL-2 pendant 5 jours. De façon remarquable, ce traitement induit une rémission du diabète chez 60% des souris, après seulement 5 jours de traitement et chez 75% des souris après 10 jours. Cette rémission est stable dans le temps pour 65% des souris en rémission. Toutefois comme d'autres traitements curatifs, lorsque la glycémie des souris NOD à l'apparition du diabète est supérieure à 350 ng/dl ce traitement ne fonctionne pas. Ceci est probablement dû à la quantité trop faible de cellules β résiduelles (**art3 Figure 1**). L'observation des coupes histologiques du pancréas des souris traitées ne montre pas de diminution de l'infiltrat. Ceci suggère que l'IL-2 modifierait la nature de l'infiltrat.

B : L'effet thérapeutique de l'IL-2 dans le DT1 passe au moins en partie par les Treg.

Pour comprendre si l'effet curatif de l'IL-2 passe par les Treg, nous avons traité à l'IL-2 des souris diabétiques CD28^{-/-} dépourvues de Treg. Nous n'avons pas observé de rémission chez ces souris traitées. Cette donnée nous a permis de confirmer que l'IL-2 agit, au moins en partie, sur les Treg pour permettre une rémission de la maladie (**art3 Figure 1**). Lorsque les souris pré-diabétiques sont traitées pendant 5 jours à l'IL-2, l'augmentation des Treg n'est observée qu'au sein du pancréas. On notera que ce n'est pas le cas chez les souris nouvellement diabétiques traitées à l'IL-2. Chez une souris NOD non manipulée, les Treg infiltrant le pancréas expriment faiblement le CD25. Sous IL-2, l'expression de CD25 et de Foxp3 est augmentée sur les Treg issus du pancréas. D'autres marqueurs spécifiques aux Treg sont augmentés tels que le CTLA-4 et ICOS (**art3 Figure3 et 5**). Ces données montrent qu'une dose faible d'IL-2 suffit à activer les Treg. Aussi, l'IL-2 à faibles doses rend les Treg plus suppressifs, car sous traitement par l'IL-2 le taux de production d'IFN- γ diminue parmi les LT dans le pancréas ou dans les ganglions drainants (**art3 Figure 4**). D'autre part, l'analyse des transcrits révèle que l'IL-2 agit préférentiellement sur les Treg par rapport aux Tconv (**art3 Figure 5**).

Article 4:

Limitations of IL-2 and rapamycin in immunotherapy of type 1 diabetes.

Audrey Baeyens*, Louis Pérol*, Gwladys Fourcade, Nicolas Cagnard, Wassila Carpentier, Janine Woytschak, Onur Boyman, Agnès Hartemann and Eliane Piaggio. *Diabetes* (2013) (sous impression) PMID: 23670972.

* : co-premiers auteurs.

Les travaux exposés dans l'article 3, montrent que l'injection d'une dose faible d'IL-2 permet la rémission du DT1 chez la souris NOD dans 60% des cas sous 5 jours de traitement. Dans le but d'améliorer le traitement par l'IL-2, nous avons testé soit des doses plus fortes d'IL-2, soit des doses faibles d'IL-2 combinées à un immunosuppresseur, la rapamycine. Cette drogue est couramment utilisée en clinique dans le cadre des rejets de greffe et permet la prévention du DT1 chez la souris NOD. De plus la rapamycine combinée à l'IL-2 présente un effet synergique dans la prévention du DT1 chez la souris NOD.

C : Effets de l'administration de fortes doses d'IL-2 chez la souris NOD.

Afin d'améliorer l'efficacité du traitement par l'IL-2, nous avons augmenté la dose d'IL-2 administrée d'un facteur 10 à 20, plus précisément 250 000 et 500 000 UI. Dans un premier temps nous avons testé l'effet de cette dose dans la prévention du DT1. Ainsi des souris NOD de 5 semaines ont reçu de fortes doses d'IL-2. Ce même traitement à des souris plus âgées peut aussi être toxique, avec par exemple une augmentation du nombre d'œdèmes pulmonaires et il précipite l'apparition du DT1 principalement chez les femelles (**art4 Figure 1**). Pourtant, une forte dose d'IL-2 n'affecte pas directement l'homéostasie du glucose. Ceci suggère que l'effet néfaste de fortes doses d'IL-2 sur l'incidence du DT1 passerait par une activation du système immunitaire.

L'analyse de l'effet des fortes doses d'IL-2 sur le système immunitaire des souris NOD traitées montre une très forte augmentation des Treg mais aussi des cellules NK, CD11c⁺ et CD11b⁺ dans le pancréas (**art Figure 2,3**). D'un point de vue phénotypique, l'IL-2 à forte dose augmente l'expression de Foxp3 et de CD25 sur les Treg, mais également la sécrétion d'IFN- γ parmi les NK et les CD8 dans le pancréas (**art4 Figure4**).

D : Effets de l'administration de faibles doses d'IL-2 combinées avec la rapamycine chez la souris NOD.

La rapamycine est originellement connue pour diminuer l'activation des Tconv et favoriser les Treg. Nous avons donc dans un premier temps analysé l'effet du traitement combiné (IL-2 faible dose et rapamycine) sur des souris NOD pré-diabétiques. Chez ces souris traitées, la rapamycine diminue la hausse des Treg induite par l'IL-2 dans le pancréas. De plus, sous IL-2 nous avons constaté une augmentation de l'expression de CD25, Foxp3, CTLA-4, ICOS, GITR. Cependant, avec le traitement combiné IL-2/rapamycine cette surexpression des marqueurs associés au phénotype régulateur est moins prononcée. De façon notable la rapamycine n'affecte pas l'augmentation des NK infiltrant le pancréas, induite par l'IL-2 (**art4 Figure 5**). De même, la rapamycine n'inhibe pas l'activation de la voie de signalisation de l'IL-2 (**art4 Figure 6**).

De façon surprenante, la combinaison du traitement à la rapamycine avec l'IL-2 inhibe l'effet curatif induit par l'IL-2. En effet, les souris nouvellement diabétiques traitées avec l'IL-2 et la rapamycine ne présentent aucune rémission de la maladie (**art4 Figure 7**). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ce traitement n'induit pas de diminution d'IFN- γ produit par les LT CD8⁺ qui infiltrent le pancréas; contrairement à ce qu'on a pu observer chez les souris traitées avec de faibles doses d'IL-2 seule (**art3 fig 6**). Ensuite nous avons cherché à déterminer si la rapamycine interrompait l'effet curatif induit par l'IL-2. Pour cela des souris précédemment diabétiques et rendues normoglycémiques par le traitement à l'IL-2 seule ont été traitées avec la rapamycine. De façon remarquable toutes les souris traitées avec la rapamycine redeviennent diabétiques. De plus dans 7 cas sur 9 le simple arrêt de la rapamycine permet à ces souris de redevenir normoglycémiques. Dans ces souris le pourcentage de Treg infiltrant le pancréas diminue sous l'effet de la rapamycine et tend à augmenter lors de la seconde rémission (**art4 Figure 7**).

Afin de mieux comprendre le mécanisme de ce phénomène, nous avons effectué des tests de tolérance au glucose à des souris traitées par l'IL-2 et la rapamycine. Nos résultats indiquent que la rapamycine seule ou en combinaison avec l'IL-2 induit une intolérance au glucose. Enfin, l'analyse des transcrits de cellules du foie de souris NOD traitées à l'IL-2 et / ou à la rapamycine a permis de confirmer que la rapamycine altère aussi dans cet organe le métabolisme du glucose (**art4 figure 8**).

En résumé, l'IL-2 à faible dose induit une rémission à long terme du DT1, alors qu'à forte dose elle devient toxique et accélère l'incidence de la maladie. Ceci indique que la fenêtre thérapeutique de l'IL-2 est assez restreinte. De plus l'association avec la rapamycine inhibe l'effet bénéfique de l'IL-2 probablement en modulant le phénotype et la migration des Treg et en dérégulant le métabolisme du glucose à différents niveaux.

DISCUSSION

Première Partie : Activation des Treg par les Tconv : un nouveau mécanisme de rétrocontrôle, le « boost Tconv → Treg ».

Les résultats des articles 1 et 2 montrent que l'activation des Tconv peut favoriser la prolifération et/ou l'activité suppressive des Treg. Ce phénomène a été observé dans deux situations inflammatoires différentes, l'une où les Tconv et les Treg sont spécifiques d'antigènes d'îlots pancréatiques (modèle murin insHA et NOD) et l'autre où ils sont spécifiques d'antigènes exogènes (modèle BALB/C). L'étude du mécanisme révèle que ce « boost » des Treg requière différents facteurs selon la situation inflammatoire. Dans la suite de cet exposé, j'utiliserai le terme de « *faible inflammation* » pour le « boost » des Treg observés dans les modèles insHA ou NOD et le terme de « *forte inflammation* » pour celui présent dans les souris BALB/C.

I : Implications et « règles » du boost des Treg par les Tconv.

Lorsque le système immunitaire fonctionne normalement, il est capable d'orchestrer une forte réponse inflammatoire vis-à-vis de pathogènes exogènes tout en maintenant l'intégrité tissulaire. Ceci requière plusieurs mécanismes cellulaires et moléculaires de régulation permettant le cas échéant, l'amplification ou la diminution de la réponse immunitaire. La balance entre les Treg et les Tconv permet de déterminer le niveau de régulation de cette réponse. De plus, plusieurs travaux récents ont observé que l'environnement inflammatoire influence l'homéostasie des Treg. Nous avons donc montré que le niveau d'activation et d'expansion des Treg est dépendant de l'activation des Tconv. Il a été précédemment montré que la proportion des Treg à l'homéostasie dans les tissus lymphoïdes dépend de la fréquence des Tconv produisant de l'IL-2. Cette observation importante a permis de conclure que le taux des Treg est indexé à la proportion des Tconv (*Almeida et al., 2006*). Dans notre projet, nous nous sommes attachés à étudier les effets de l'activation des Tconv sur les Treg dans un contexte faiblement inflammatoire et fortement inflammatoire. Ces résultats nous ont permis de définir certaines règles concernant le « boost Tconv → Treg » :

- (i) Celui-ci est observé quand les 2 types cellulaires sont activés par leur antigène cognitif. Si les Tconv ou les Tregs ne sont pas ou très faiblement activés, cas de figure lorsqu'on transfère des LT polyclonaux, nous n'observons pas de boost.

-(ii) Les Treg et les Tconv n'ont pas besoin d'être spécifiques du même épitope T pour qu'il y ait boost.

-(iii) Celui-ci n'est présent que lorsque les Treg sont faiblement activés. Dans des contextes où les Treg seuls sont fortement activés, l'ajout de Tconv ne fera pas encore augmenter leur prolifération.

-(iv) Ce boost n'est pas systémique puisqu'il nécessite une activation loco-régionale des Treg et des Tconv, soit dans le même ganglion ou dans des ganglions drainants des zones proches ou chevauchantes (par exemple les ganglions poplités et inguinaux collatéraux).

-(v) Enfin, les mécanismes moléculaires sont différents en fonction du contexte et peuvent impliquer l'IL-2 ou des membres de la famille du TNF.

Mais ce phénomène de “boost Tconv→Treg” est-il observé dans d'autres contextes et les règles que l'on vient de décrire s'appliquent-elles à d'autres situations? Les données de la littérature nous donnent une première réponse.

L'équipe d'A Abbas a observé une expansion des Treg quelques heures seulement après l'activation des Tconv. Pour cela ils ont transféré des LT CD4⁺ issus de souris présentant un TCR transgénique spécifique de l'OVA à des souris BALB/C. Après transfert des LT, les souris BALB/C ont été immunisées avec le peptide OVA par voie intraveineuse (i.v.). L'expansion des Treg serait médiée par la sécrétion d'IL-2 produite par les Tconv activés (*O'Gorman et al., 2009*). Ces données sont en accord avec nos travaux effectués dans le contexte fortement inflammatoire des souris BALB/C immunisées en présence de l'adjuvant CFA, montrant que l'augmentation de l'expansion des Treg est dépendante de l'IL-2. Pourtant, dans les données du groupe d'Abbas, ils ont observé un effet systémique du boost qui peut s'expliquer par le fait que les Tconv sont activés de façon systémique (immunisation en iv). C'est pourquoi, dans notre modèle utilisant des LT spécifiques de HA, nous avons étudié si un “boost Tconv→Treg” peut s'observer également lorsque les cellules sont activées par voie i.v. ça n'a pas été le cas (données non montrées). Une hypothèse pour expliquer cette différence de résultats serait que le taux d'IL-2 soit plus fort dans le modèle OVA.

Dans un contexte d'infection virale induite par l'inoculation d'un rétrovirus, l'activation des Tconv contre ce virus induit l'expansion des Treg. Celle-ci est dépendante du TNF- α mais pas de l'IL-2 (*Myers et al., 2013*). Ces données sont comparables avec ce qu'on observe dans le contexte de faible inflammation. Ainsi, le « boost » des Treg peut s'effectuer dans un contexte inflammatoire induit par une réponse antivirale.

De façon plus générale, on observe souvent que l'inflammation est associée à une forte proportion des Tregs, sans que le rôle des Tconv ne soit connu ou étudié.

D'autre part, dans de nombreux cancers, la réponse anti-tumorale est corrélée à une expansion des Treg infiltrant la tumeur (*Darrasse-Jeze et al., 2009a; Gobert et al., 2009*).

En ce qui concerne les maladies auto-immunes, une hausse de la proportion des Treg est souvent corrélée avec l'avancement de la pathologie. Dans le cas du DT1, la proportion de Treg dans le pancréas augmente progressivement jusqu'à l'apparition de la maladie. Le taux de Treg présents dans le site enflammé peut même être supérieur à celui observé dans les organes lymphoïdes. En effet à l'état basal, la proportion des Treg dans les ganglions est de 10% parmi les LT CD4⁺ totaux alors qu'elle peut atteindre 15% dans le pancréas (*Tang et al., 2008*) (nos données). Cette hausse de la proportion des Treg infiltrant le pancréas est en partie causée par une augmentation de la prolifération de ces Treg. Toutefois cette augmentation des Treg ne suffit pas à contrôler l'auto-immunité, ceci pourrait s'expliquer par un défaut de survie, une diminution de la fonction suppressive, ou encore une résistance des Tconv à la suppression (*D'Alise et al., 2008; Gregori et al., 2003*). Cependant on peut supposer que les Tconv activés participent à l'induction de la prolifération des Treg. Dans d'autres maladies auto-immunes, la pathogénèse est aussi corrélée avec une hausse de la proportion des Treg. Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, une augmentation de la proportion des Treg est observée dans le liquide synovial de l'articulation enflammée (*Ruprecht et al., 2005*). Enfin dans le modèle d'EAE, la proportion des Treg est fortement augmentée jusqu'à 50% des LT CD4⁺ dans le système nerveux central lors de la rémission (*Korn et al., 2007*), et une déplétion de ces cellules aggrave les signes cliniques (*O'Connor and Anderton, 2008*). Dans ces conditions, comme dans le cancer, l'augmentation de l'expansion des Treg induits par les Tconv activés reste hypothétique.

A l'inverse, dans certains sites enflammés, les Treg peuvent être appauvris. C'est le cas de la *lamina propria* après infection par *Toxoplasma gondii*. Ce résultat s'explique par un déficit en IL-2 entraînant un défaut de survie des Treg (*Belkaid and Tarbell, 2009*).

	auto-immunité		induit par du CFA
<i>description</i>			
Font génétique	nod	insHA	Balb/c
spécificité des LT	autoréactifs		exogènes
Prolifération Treg seul	faible		forte
Amplitude du boost Tconv-->Treg	forte		faible
<i>mécanisme, dépendance:</i>			
pDC	oui		oui/non
IL-2	non		oui
TNF- α	oui		oui
OX40	oui		n.d.

Tableau 7 : Description comparative du “ Boost Tconv→Treg ” lorsque les LT sont spécifiques d’antigènes endogènes ou exogènes.

II : L'augmentation de la proportion des Treg n'est-elle due qu'à l'effet du boost sur la prolifération des Treg ?

Les causes de l'augmentation des Treg dans le site enflammé sont probablement diverses et ne sont pas uniquement causées par une hausse de la prolifération des Treg présents sur le site. Dans nos travaux, nous avons pu exclure le rôle d'une conversion accrue de Tconv en Treg dans la mesure où nous regardons l'expansion de cellules déjà différenciées en Treg au moment de l'injection. Par contre, il est probable que dans certains contextes d'inflammation, une forte proportion de Treg pourrait être due en partie par un phénomène massif de conversion de Tconv en Treg. C'est probablement le cas dans certaines tumeurs du fait de l'abondance en TGF- β , PDL1 ou d'IDO. Toutefois, l'augmentation de la proportion des Treg sur les sites enflammés peut être due à un recrutement de ces cellules. Ça semble être le cas dans nos deux contextes inflammatoires dans la mesure où même la proportion des Treg non divisés est augmentée en présence de Tconv dans le ganglion drainant et dans le tissu exprimant leur antigène cognitif.

A : L'amplitude du “ boost ” des Treg.

Dans un contexte faiblement inflammatoire, l'amplitude du “ boost ” des Treg est beaucoup plus élevée que celle observée dans le modèle induit par le CFA. En effet dans les modèles insHA ou NOD le nombre absolu de Treg divisés augmente d'un facteur 10 à 20 en présence de Tconv activés (art1 Figure 1) alors que dans les souris BALB/C ce facteur est de 2 à 7 (art 2 Figure 3-4). Cette différence peut s'expliquer par le fait que la prolifération basale des Treg transférés seuls est plus importante dans le modèle BALB/C. D'ailleurs si ces Treg transférés seuls prolifèrent trop fortement ils ne peuvent pas être “ boostés ” par les Tconv. Une diminution de la quantité administrée d'antigènes exogènes permet aux Treg transférés seuls de moins proliférer et d'être ainsi “ boostés ” en présence de Tconv. Ceci suggère que le “ boost ” des Treg est limité par l'état d'activation des Treg, s'ils sont trop activés les Tconv ne peuvent pas les faire proliférer plus.

B : La spécificité antigénique.

Dans un contexte auto-immun, nous avons observé que le “ boost Tconv→Treg ” a lieu lorsque ces LT sont spécifiques du même antigène. Le transfert adoptif de Tconv BDC2.5 à une souris NOD provoque une hausse de la prolifération des Treg endogènes dans le pancréas

(art 1 Figure 4). En se basant sur l'hypothèse que les Treg qui prolifèrent ne sont pas tous spécifiques de la chromogranine A (antigène reconnu par les LT issus de souris BDC2.5) (Stadinski *et al.*, 2010) on peut suggérer que les Tconv transférés induisent aussi une prolifération des Treg de spécificités différentes. Dans ce cas, les Tconv activeraient les Treg par effet "bystander".

Dans un contexte de forte inflammation, l'administration de Tconv HA₁₁₁ induit un "boost" des Treg HA₁₂₆ (art 2 Figure 4). Cette expérience indique que le "boost Tconv→Treg" s'effectue en présence de Treg et de Tconv de spécificité différente vis-à-vis d'un même antigène, ainsi les Tconv par effet bystander peuvent induire une hausse de la prolifération des Treg d'une autre spécificité.

Nous avons observé que les mécanismes moléculaires du boost peuvent être différents.

III : Les différences de mécanisme du "boost Tconv→Treg" selon les contextes inflammatoires.

Nous avons mis en évidence dans deux situations différentes une augmentation de la prolifération des Treg par les Tconv spécifiques d'antigènes endogènes ou exogènes. Toutefois ces deux "boost Tconv→Treg" diffèrent (Tableau 7). Dans ces deux cas, l'activation des Tconv est l'élément principal du boost des Treg.

A : Les facteurs moléculaires.

1 : L'IL-2 et le "boost Tconv→Treg".

L'IL-2 est la cytokine essentielle au développement et à la survie des Treg. (CF introduction deuxième partie III). L'équipe d'A Abbas a observé que suite à un transfert adoptif de LT à des souris immunisées avec le peptide OVA, les Treg se mettent à proliférer quelques heures après leur activation via un signal induit par l'IL-2 (O'Gorman *et al.*, 2009). En revanche, dans un contexte inflammatoire induit par du CFA, l'ajout d'IL-2 seul ne permet pas d'augmenter la prolifération des Treg ce qui montre que l'IL-2 ne peut se substituer aux Tconv pour pouvoir "booster" les Treg. Dans ce contexte, le co-transfert de Tconv IL-2^{-/-} ne produit qu'un très faible "boost" des Treg. Cette expérience a permis de mettre en évidence que le "boost" des Treg est dépendant de l'IL-2 en cas de forte inflammation. Cette cytokine

est donc nécessaire mais pas suffisante dans ce boost. Ainsi, les Tconv activés relarguent dans l'environnement de fortes quantités d'IL-2 qui sont absorbées par les Treg, leur permettant de proliférer et potentiellement d'inhiber l'activation des Tconv. D'une part cette IL-2 permet l'activation des Treg qui par d'autres mécanismes peuvent réprimer les Tconv activés (*Barron et al., 2010; Tran et al., 2009b*) (CF introduction deuxième partie). De plus la forte expansion des Treg pourrait limiter l'activation des Tconv en consommant fortement l'IL-2 environnante (*Pandiyani et al., 2007*). Enfin, une étude récente a montré que les Treg exprimant fortement ICOS répondraient mieux à l'IL-2 contrairement aux Treg l'exprimant plus faiblement. Ces Treg ICOS^{high} auraient une meilleure fonction suppressive et une meilleure capacité à proliférer (*Kornete et al., 2012*). Toutefois, dans une situation auto-immune, l'injection de Tconv HA₁₁₁ IL-2^{-/-} à des souris insHA n'empêche pas le "boost" des Treg. Cette donnée indique que dans ce contexte, le "boost" des Treg est indépendant de l'IL-2. Les Treg boostés expriment plus fortement le CD127, le récepteur à l'IL-7. Cette observation suggère que l'IL-7 favoriserait la survie des Treg "boostés" (*Harnaha et al., 2006*). De plus une étude récente a montré que contrairement à l'IL-2, l'IL-7 est nécessaire au maintien des Treg mémoires dans les tissus périphériques (*Gratz et al., 2013*). L'IL-7 pourrait donc permettre aux Treg boostés une meilleure survie et favoriserait leur recrutement dans le tissu cible.

Ces données montrent que d'autres facteurs, en plus de l'IL-2, peuvent participer au "boost".

2 : Le TNF- α

De façon remarquable, le TNF- α , cytokine aux propriétés inflammatoires semble intervenir dans le mécanisme du "boost Tconv→Treg". Dans les deux situations inflammatoires étudiées, le TNF- α joue un rôle important dans ce mécanisme. Comme discuté plus loin, de nombreuses questions demeurent car le TNF- α peut être produit par de nombreux types cellulaires et son action est pléiotropique. Ainsi, dans les 2 situations décrites dans les articles 1 et 2, nous ne savons pas à ce jour quelle est la source cellulaire du TNF- α ou encore s'il y a un effet direct de la cytokine sur les Treg. Ces questions seront discutées plus en détail plus loin. Ce qu'il est important de discuter ici concerne les controverses sur l'effet du TNF sur la fonction suppressive des Treg.

2a : Le TNF- α et la fonction suppressive des Treg.

Le rôle du TNF- α sur la fonction suppressive est controversé. *In vitro* chez l'homme, une levée partielle de la suppression exercée par les Treg sur les Tconv est observée lorsque du TNF- α est ajouté à la culture (Zanin-Zhorov *et al.*, 2010). Dans ces conditions, il semblerait que le TNF- α induise une résistance des Tconv à la suppression par les Treg, plutôt qu'une diminution de la fonction suppressive des Treg (Walker, 2009). Cependant des Treg humains pré-incubés pendant 12 à 24 heures avec du TNF- α ne sont plus capables d'inhiber les Tconv dans une culture secondaire, suggérant un effet inhibiteur de la cytokine directement sur les Treg (Valencia *et al.*, 2006; Zanin-Zhorov *et al.*, 2010). De plus, chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, certaines études montrent qu'un traitement par des anti-TNF- α est associé à une augmentation des Treg dans le sang sur le long terme (Notley and Ehrenstein, 2010), bien que d'autres études ne confirment pas ces données (Blache *et al.*, 2011). Les anti-TNF- α pourraient restaurer *in vitro* et *in vivo* une fonction déficiente des Treg des patients qui ont une polyarthrite rhumatoïde (Nie *et al.*, 2013). Toutefois, nos données et celles de JJ Oppenheim vont à l'encontre de ces observations. En effet, nous avons observé dans le modèle ins-HA que le boost des Treg par les Tconv, qui est dépendant du TNF- α , est associé à une augmentation de la fonction suppressive des Treg (**art1 Figure2**). De même, l'équipe de JJ Oppenheim a observé une augmentation de la fonction suppressive des Treg murins. Cependant, il y aurait un effet délétère transitoire du TNF- α sur la fonction suppressive des Treg qui serait remplacé par une augmentation de cette fonction suppressive après 48h de culture (Chen *et al.*, 2007). Ceci expliquerait l'effet positif du TNF- α que nous avons observé *in vivo*. De plus, les travaux de JJ Oppenheim ont révélé que la fraction de Tconv exprimant le TNFR-2 est résistante à la suppression des Treg en présence de cette cytokine (Chen *et al.*, 2007). De même, des données *in vitro* non publiées de notre équipe suggèrent que l'effet inhibiteur du TNF- α sur la suppression des Tconv par les Treg s'explique par le fait qu'en présence de cette cytokine, les Tconv prolifèrent plus fortement, les rendant plus réfractaires à la suppression par les Treg, comme décrit dans la littérature (par ailleurs, dans l'équipe, nous avons également étudié l'effet direct *in vivo* du TNF- α sur les Treg en administrant cette cytokine à des souris, et 1-3 jours après en testant la fonction suppressives des Treg *ex vivo*). En suivant ce protocole, nous n'avons pas observé d'effet sur la fonction de ces cellules (données non publiées). Un autre paramètre est important à prendre en compte : le TNF- α n'est pas neutre quant à la différenciation d'iTreg. En effet, un récent travail montre que

l'administration d'anti-TNF- α ou d'anti-TNFR-2 entraîne une augmentation de la différenciation des iTreg (*Zhang et al., 2013a*).

Comment avoir une vue claire sur l'effet du TNF- α sur les Treg ? La première possibilité, la plus simple, est qu'il y aurait une différence d'espèce. Chez la souris, le TNF- α stimulerait plutôt la fonction suppressive des Treg (sauf à court terme), alors que la cytokine l'inhiberait chez l'homme. L'explication est probablement plus compliquée car le groupe de JJ Openheim a également observé que la fonction suppressive des Treg est également augmentée chez l'homme par un traitement par anti-TNF- α . La difficulté de conclure vient probablement du fait que le TNF- α stimule non seulement les Treg mais également les Tconv les rendant réfractaires à la suppression. Enfin, l'effet inhibiteur du TNF- α sur la différenciation des iTreg pourrait expliquer l'augmentation des Treg chez les patients qui ont une polyarthrite rhumatoïde traités par anti-TNF- α .

2b : La voie de signalisation TNF- α et NF- κ B.

Le TNF- α peut activer différentes voies de signalisations qui induisent soit un signal de mort plutôt via la voie canonique de NF- κ B ou un signal de survie et de prolifération plutôt via la voie alterne de NF- κ B.

La signalisation du TNF- α via le récepteur TNFR-1 entraîne l'activation de la voie canonique qui active des caspases conduisant à l'apoptose de la cellule ou à des signaux d'activation avec production de cytokines inflammatoires (*Aggarwal, 2003*). L'activation de celle-ci conduit à la translocation d'hétérodimères de NF- κ B1/ p50, RelA ou de c-Rel (*Rauert et al., 2010*). Les propriétés inflammatoires de cette voie ont été mises en évidence dans de nombreux modèles. Par exemple les souris TNFR-1^{-/-} sont protégées de l'EAE. Inversement la signalisation du TNF- α via le TNFR-2 déclencherait plutôt la voie alterne de NF- κ B. L'activation de cette voie conduit à la translocalisation d'hétérodimères de RelB et de NF κ B1/p52 (*Rauert et al., 2010*). L'activation de cette voie de signalisation permet la survie et la prolifération des LT. De façon notable, une étude récente a montré que les souris déficientes pour I κ B présentent une réduction des Treg à la périphérie. D'ailleurs cette réduction semble être causée par un défaut d'induction de Treg (*Schuster et al., 2012*).

De plus, plusieurs études ont montré le rôle important de cRel dans la différenciation thymique des Treg.

A l'état basal, une fraction des Treg exprime le TNFR-2 et très peu TNFR-1 (*Chen et al., 2008*). Ces Treg exprimant plus fortement le TNFR-2 seraient plus fortement activés et présenteraient une meilleure capacité suppressive (*Chen et al., 2008*). Enfin, l'analyse des transcrits des Treg boostés in vitro montre une augmentation de l'expression de gènes codants pour des médiateurs de la voie alterne comme NIK et RelB (fig1 art 6). L'ensemble de ces données suggère que l'impact du TNF- α sur le "boost" des Treg passerait par le TNFR-2. La source exacte du TNF- α n'est pas connue, elle peut provenir des Tconv ou des DC. De plus, il semble que le TNF- α , augmente l'expression de TNFR-2 à la surface des Treg (*Hamano et al., 2011*). Ainsi il y aurait une boucle d'amplification positive qui pourrait favoriser la voie alterne de NF- κ B dans les Treg via le TNF- α .

2c : Le TNF dans le diabète spontané de la souris NOD.

Plusieurs études montrent des effets opposés du TNF- α ou des anti- TNF- α dans les maladies auto-immunes selon l'état d'avancement de la pathologie. Dans un modèle de diabète, l'injection de TNF- α à des souris jeunes accélère la maladie (*Yang et al., 1994*), ce qui est associé à une diminution du taux de Treg endogènes (*Wu et al., 2002*). En revanche, ce traitement à des souris adultes, diminue l'incidence du diabète. Les auteurs expliquent cette différence de l'effet du TNF- α par un modèle en deux temps. Dans un premier temps, le TNF- α serait plutôt pathogène en activant les cellules de l'immunité innée infiltrant le pancréas. Puis, le TNF- α aurait un rôle régulateur en activant les Treg ou en activant les Tconv pathogènes (*Wu et al., 2002*).

3 : OX 40.

Un autre membre de la super famille des TNFR, OX40 est une molécule de co-stimulation qui est exprimée par les LT et particulièrement par les Treg. Bien que son rôle dans l'homéostasie des Treg soit débattu (CF introduction deuxième partie III) des études récentes suggèrent que l'activation d'OX40 induit la prolifération des Treg.

Dans le contexte de faible inflammation, nous avons observé que l'ajout d'un anticorps d'OX40-L neutralisant inhibe partiellement le "boost" des Treg. Cette observation montre que cette voie est impliquée dans l'expansion des Treg induite par les Tconv activés. Il existe très peu de données sur les signaux transduits par OX40 dans les Treg. On peut supposer qu'il y aurait une activation de NF- κ B, comme avec le TNF- α . L'absence d'effet

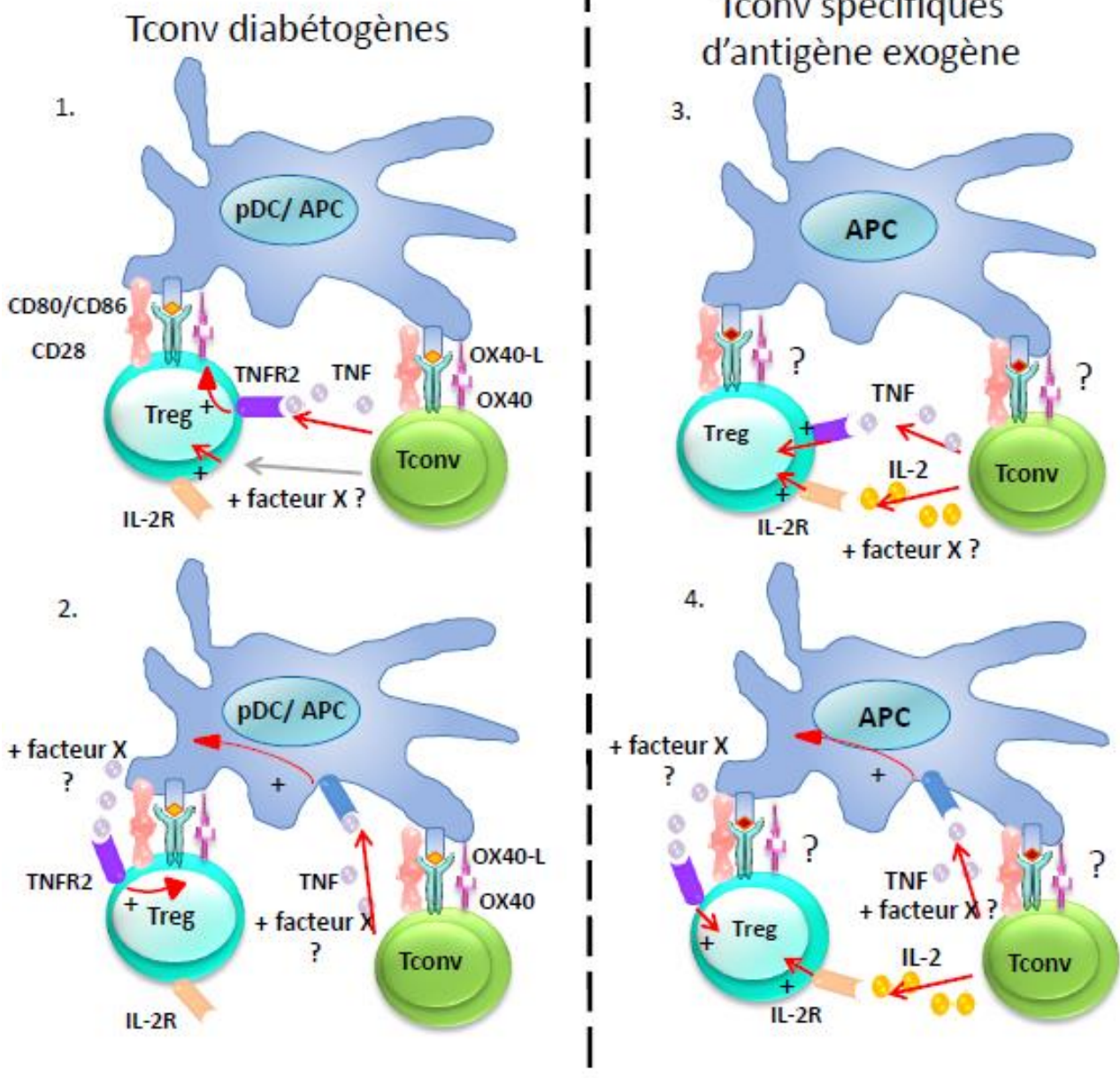


Figure 31. Mécanismes supposés du “boost” des Treg selon les conditions inflammatoires. Dans un contexte où les LT sont spécifiques d’antigènes endogènes, Les Tconv peuvent sécréter le TNF et/ ou le facteur X qui vont agir directement sur les Treg favorisant leur prolifération et leur survie. Le TNF peut induire l’expression d’OX40 sur les Treg qui induirait l’augmentation de leur expansion via les pDC (1). Le TNF sécrété par les Tconv peut aussi agir sur les pDC ou APC induisant l’expression de TNF et d’un facteur X permettant l’activation des Treg (2). Dans le cas où les LT sont activés contre des exogènes, l’IL-2 et le TNF sécrété par les Tconv vont activer l’expansion des Treg (3). Une autre possibilité serait que le TNF agisse sur les APC dans le but d’induire un facteur X ou la sécrétion du TNF afin de participer avec l’IL-2 à l’induction du boost des Treg (4). Il est aussi possible que la voie OX40/OX40L participe à l’induction de ce “boost”. Dans les deux cas la combinaison de ces deux possibilités est envisageable.

additif ou de synergie de l'inhibition du boost lorsque les voies OX40 et TNF sont bloquées suggère que ces deux molécules seraient impliquées de façon séquentielle dans le boost. Ceci suggère aussi qu'il y aurait un autre facteur intervenant dans le mécanisme du "boost".

Le ligand d'OX40 est exprimé par les CPA. Ainsi l'interaction entre les CPA et les Treg permettrait une augmentation de leur prolifération. D'ailleurs une étude a montré que des DC induits par le GM-CSF favorisent la prolifération des Treg via OX40/OX40-L. De plus l'injection de ces DC permet de contrôler la thyroïdite expérimentale, en favorisant l'expansion et la fonction suppressive des Treg (*Gopisetty et al., 2013*).

Enfin, il a été décrit qu'OX40 permet aussi l'augmentation de la sécrétion d'IL-2 par les LT (*Gramaglia et al., 1998*). Dans le cas d'une inflammation induite par le CFA, on peut supposer que la voie OX40/OX40-L favoriserait la sécrétion d'IL-2 produite par les Tconv activés et participerait au "boost" des Treg. Pour cela on pourrait tester l'implication de cette voie en l'inhibant in vivo par un anticorps anti OX40-L.

B : Les facteurs cellulaires, l'implication des pDC.

Nous avons abordé précédemment que les pDC jouent un rôle important dans l'homéostasie des Treg (CF introduction partie III). Dans un contexte d'auto-immunité comme le diabète ou l'EAE, une déplétion des pDC augmente l'agressivité de la maladie (*Irla et al., 2010*). Nos résultats montrent qu'une déplétion des pDC induit une diminution de la prolifération des Treg dans le boost. Les pDC seraient donc impliqués. Plusieurs explications seraient possibles pour comprendre le rôle des pDC dans le boost des Treg. Il a été décrit que les pDC expriment fortement ICOS-L lorsqu'ils sont activés (*Janke et al., 2006*). Or la prolifération des Treg est en corrélation à l'augmentation de l'expression d'ICOS sur ces cellules. Dans un contexte faiblement inflammatoire, on pourrait donc supposer que les Treg exprimant fortement ICOS pourraient s'activer via les pDC (*Faget et al., 2012*). D'autre part, il a été décrit que les pDC peuvent exprimer OX40-L (*Ito et al., 2004*). On pourrait donc suggérer que l'action des pDC passerait pas la voie OX40/ OX40L afin d'activer les Treg. Dans le cas où les LT sont spécifiques d'antigènes exogènes, l'inhibition des pDC entraîne une baisse non significative du boost des Treg. Ceci montre que dans des conditions de forte inflammation provoquée par du CFA, le rôle des pDC n'est que secondaire, probablement

parce que l'entourage cytokinique suffit à favoriser un boost des Treg ou parce que d'autres CPA participent à ce phénomène.

C : Les mécanismes possibles du boost des Treg

Nous avons mis en évidence deux types de mécanismes du boost des Treg dans différents contextes inflammatoires. Bien que nous ayons mis en évidence le rôle du TNF- α , de l'IL-2, d'OX40/OX40-L et des pDC, le mécanisme du boost des Treg n'est pas encore complètement éclairci et il se pourrait qu'un autre facteur X non connu à ce jour intervienne (**Figure 31**).

Dans un contexte de faible inflammation, lorsque les LT sont spécifiques d'antigènes endogènes, le boost des Treg est dépendant du TNF- α , des pDC et d'OX40/OX40-L. On peut supposer que le TNF- α et/ou le facteur X sécrété(s) par les Tconv agirait directement sur les Treg en activant leur expansion. Le TNF- α favoriserait la survie et la prolifération des Treg via le TNFR-2, mais augmenterait aussi l'expression d'OX40 ce qui pourrait également booster les Treg par les pDC ou par d'autres CPA exprimant OX40-L (*Chen et al., 2010*). Un autre mécanisme possible serait que le TNF- α ou le facteur X produit par les Tconv agirait sur les pDC. Ceci aurait pour conséquence une activation de ces CPA qui se mettraient à produire du TNF- α et à sur exprimer certaines molécules de co-stimulation qui favoriseraient la prolifération des Treg.

Dans un contexte de forte inflammation, l'IL-2 produite par les Tconv joue un rôle important. Il semble que cette interleukine puisse agir directement sur les Treg en entraînant leur prolifération et leur survie. Toutefois le TNF- α a aussi un rôle dans ce boost des Treg. L'action du TNF- α peut se faire directement sur les Treg ou par l'intermédiaire des CPA. Dans ce contexte, on ne peut pas exclure que le TNF- α et l'IL-2 soient les seuls responsables de ce « boost », un facteur X pourrait participer à l'induction du « boost des Treg ».

Deuxième partie : à la recherche d'une thérapie du DT1.

Ces dernières années, les différents travaux menés montrent que l'IL-2 a un rôle majeur dans l'expansion et la survie des Treg. Nous avons donc testé son efficacité thérapeutique dans le DT1. Les résultats obtenus chez la souris NOD montrent que l'IL-2 peut induire une rémission de la maladie, ceci même après l'arrêt du traitement. Cet effet curatif semble reposer préférentiellement sur les Treg. Toutefois l'IL-2 n'induit que 60% de rémission, nous avons donc testé différentes stratégies expérimentales dans le but d'améliorer son efficacité. Ainsi nous avons testé différentes doses d'IL-2 plus fortes ou combiné ce traitement avec un immunosuppresseur, la rapamycine. Malheureusement, ces deux derniers ne fonctionnent pas. Dans cette partie, je m'attacherai à discuter les causes de ce dysfonctionnement et ce qui pourrait nous permettre d'entrevoir de nouvelles approches thérapeutiques.

I : Le choix du modèle NOD.

Il est évident que les modèles animaux sont indispensables au développement de nouvelles thérapies. Ces 30 dernières années, le modèle NOD a été utilisé pour disséquer les facteurs génétiques et les facteurs immunologiques conduisant au DT1. Toutefois, ce modèle présente à la fois de nombreuses similitudes et différences avec l'homme. A partir du modèle NOD de nombreux loci génétiques, présentant des susceptibilités au DT1, ont été identifiés chez l'homme, tels que l'idd1, idd2, idd3, Idd5.1.... Cependant certains de ces loci reconnus chez la souris n'ont toujours pas trouvé d'homologue humain. D'un point de vue thérapeutique de nombreux traitements préventifs ou curatifs du DT1 ont été trouvés dans le modèle murin ; par exemple le traitement par l'anti-CD3, qui semble prometteur chez l'homme, a été préalablement découvert chez la souris (*Chatenoud et al., 1994*). En revanche, d'autres traitements découverts chez la souris ont été testés en clinique chez l'homme sans apporter les résultats escomptés. En effet certains traitements présentent une trop forte toxicité ou tout simplement n'ont pas d'effet sur la maladie chez l'humain. Comme par exemple l'administration d'insuline par voie intranasale ne permet pas la prévention du DT1 chez l'homme (*Nanto-Salonen et al., 2008*) ; ou encore l'administration de cyclosporine A qui a dû être interrompue car elle présentait des effets secondaires trop importants (*Feutren et al., 1986*). A partir de ces observations on peut considérer que bien que le modèle NOD soit un

outil essentiel à la découverte de nouvelles thérapies, il y a une marche importante à franchir pour trouver une application thérapeutique chez l'homme. Il faut prendre en considération les différences qui existent entre l'homme et la souris, les effets secondaires potentiels et la dose adéquate à administrer. Inversement, le modèle NOD peut aussi nous aider à comprendre pourquoi certains traitements ne fonctionnent pas chez l'homme, c'est le cas de notre étude avec l'IL-2 et la rapamycine.

II : Le rôle des Treg comme cible thérapeutique du diabète.

Pourquoi cibler particulièrement les Treg dans le DT1 ? Plusieurs traitements expérimentaux modulant directement ou indirectement le nombre ou la fonction des Treg ont démontré leur efficacité dans le diabète (**CF introduction troisième partie II**). Il a été démontré que l'anti-CD3 induit une rémission chez 80% des souris NOD diabétiques (*Chatenoud et al., 1994*). Plusieurs années plus tard, il a été compris que cette rémission est en partie causée par la conversion des Tconv en Treg via le TGF- β (*Belghith et al., 2003; You et al., 2007*). D'ailleurs ce traitement fonctionne aussi dans les souris CD28^{-/-} déficientes en Treg thymiques.

D'autre part, une autre étude a montré que l'administration d'anti-CD20 éliminant les LB induit une rémission du DT1 chez la souris NOD (*Hu et al., 2007*). Cette étude montre une augmentation des Treg à long terme dans la rate. Il en est de même pour la rémission induite par l'injection d'une molécule anti-inflammatoire comme l' α 1-antitrypsine, qui permet une accumulation de Treg et une hausse de la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β dans le pancréas (*Koulmanda et al., 2007; Lewis et al., 2008*). On peut supposer que cette thérapie influencerait l'activité suppressive des Treg. Toutefois l'équipe de D. Mathis et C Benoist a observé que les Treg issus des souris NOD ne posséderaient pas d'altération de leur capacité suppressive, mais plutôt que les Tconv seraient réfractaires à cette suppression (*D'Alise et al., 2008*). On notera que dans cette étude la capacité suppressive des Treg issus du pancréas n'a pas été testée. Or d'autres travaux ont montré que chez la souris NOD la fonction suppressive des Treg diminue en fonction de l'âge (*You et al., 2005*). De plus notre équipe, ainsi que d'autres, avons montré que les Treg infiltrant le pancréas expriment faiblement le CD25, ce qui laisse suggérer que ces cellules ont une altération de leur rôle suppresseur.

L'ensemble de ces études montrent que la rémission du DT1 serait médiée par une augmentation du nombre et de la capacité suppressive des Treg dans le pancréas ou dans le ganglion drainant.

III : L'effet curatif de l'IL-2 chez la souris NOD, une question de dose !

Comme décrit précédemment l'IL-2 est une cytokine aux fonctions multiples, à forte dose elle peut induire l'activation et l'expansion des LT, à faible dose elle favorise la survie et la prolifération des Treg. Chez l'homme, les patients possédant certains variants génétiques du récepteur à l'IL-2 ont une susceptibilité augmentée de développer un diabète. L'étude des Tconv de ces patients montre qu'ils expriment moins de récepteurs à l'IL-2 et par conséquent produisent moins d'IL-2. Dans ce cas les Treg seraient moins activés et donc moins capables de supprimer les Tconv diabétogènes (*Garg et al., 2012*).

A : L'IL-2 à faible dose.

Nous avons testé l'ajout d'IL-2 exogène dans le but de rétablir la fonction et même l'augmentation des Treg dans le pancréas. Contrairement à d'autres travaux nous n'observons pas d'augmentation du pourcentage de Treg infiltrant le pancréas chez les souris guéries. En revanche, ces Treg ont une expression augmentée d'ICOS, CTLA-4, GITR, CD25 et Foxp3, ce qui suggère une activation de ces cellules et qu'ils répondraient mieux à l'IL-2 environnante. D'ailleurs une étude récente a montré que les Treg activés exprimant fortement ICOS sont plus sensibles à l'IL-2 et plus suppresseurs (*Kornete et al., 2012*). On pourrait penser que les Treg présents dans le pancréas de la souris NOD ne sont pas réellement capables de s'activer et que l'ajout de faibles doses d'IL-2 suffit à amorcer cette activation leur permettant de contrôler l'auto-immunité à long terme. Enfin, l'IL-2 augmenterait aussi la survie de ces Treg via la diminution de Bim et l'augmentation de bcl-2 (*Barron et al., 2010*). A l'inverse de l'anti-CD3, il semble que l'IL-2 seule ne permette pas l'induction de Treg (CD4⁺ Foxp3⁺) dans le pancréas (*CF annexe*).

Ainsi une cure à faibles doses d'IL-2 active suffisamment les Treg en favorisant leur survie et leur fonction pour guérir les souris du DT1 à long terme. D'ailleurs à cette dose, il semble que seuls les Treg soient touchés à l'exception des NK infiltrant le pancréas. On pourra remarquer que cette augmentation des NK a lieu uniquement dans le pancréas et non

dans les ganglions drainants ni dans la rate. Toutefois une hausse de la prolifération de ces cellules a été observée dans ces organes. Ceci suggère que l'IL-2 favorise le recrutement, l'activation et la survie des NK dans le pancréas enflammé. Une étude récente confirme nos données, montrant une augmentation des NK dans le pancréas après traitement avec l'IL-2 complexe (*Sitrin et al., 2013*). En effet les NK expriment certains récepteurs de la famille γC dont le récepteur à l'IL-7, à l'IL-15 et plus faiblement le récepteur à l'IL-2. Toutefois, le rôle pathogène des NK dans le DT1 est controversé (*Beilke et al., 2012; Gur et al., 2010*) et n'affecte pas la rémission induite par l'IL-2, probablement parce que les NK sont réprimés par les Treg. D'ailleurs une étude récemment publiée montre qu'une délétion des Treg induit une augmentation des NK infiltrant le pancréas. Les Treg contrôleraient les NK en consommant l'IL-2, empêchant ainsi les NK de s'activer (*Gasteiger et al., 2013; Sitrin et al., 2013*).

B : L'IL-2 à forte dose (Tableau 8).

Une augmentation, d'un facteur 10 seulement, de la dose curative d'IL-2 du DT1, induit une hyper activation de tout le système immunitaire et précipite l'apparition de la maladie. En effet, nos données montrent une augmentation des LT pathogènes sécrétant de l'IFN- γ , des NK, des neutrophiles et des LB dans le pancréas ; ce malgré une augmentation de la proportion et de la prolifération des Treg.

A cette dose nous avons observé une précipitation des signes cliniques de la maladie et un effet toxique important. Cette augmentation de l'incidence et de l'effet toxique semble être plus importante chez les femelles que chez les mâles. Chez la souris NOD les femelles sont plus susceptibles au diabète, on pourrait penser donc que cette toxicité dépend aussi du sexe. D'autre part, il a été décrit que de fortes doses d'IL-2 peuvent agir directement sur les cellules endothéliales (*Baluna et al., 1999; Cotran et al., 1988*) ou via l'activation du système immunitaire produisant des cytokines inflammatoires (*Assier et al., 2004; Baluna and Vitetta, 1997*). Certaines de ces cellules, comme les cellules endothéliales pulmonaires, expriment les récepteurs à l'IL-2. Les travaux d'O Boyman ont montré que l'IL-2 à forte dose agit directement sur les cellules du poumon et provoque des oedèmes (*Krieg et al., 2010*). Ces travaux et nos résultats montrent l'importance du choix de la dose d'IL-2 à administrer pour avoir un effet toxique minimal tout en gardant un effet bénéfique maximal. De façon notable certaines de ces souris traitées pendant plus d'un mois avec de fortes doses d'IL-2 ne

		faible dose (25 000 UI)		forte dose (250 000; 500 000 UI)	
effet sur le TD1.		prévention et rémission		accélération du diabète/effet toxique	
		proportion/ prolifération	phénotype	proportion/ prolifération	phénotype
Treg (Foxp3 ⁺ , CD4 ⁺)	systémique	(=)	(=)	↗	↗ de l'expression du CD25/ Foxp3
	ganglion drainant	(=)	↗ de l'expression du CD25/ Foxp3	↗	
	pancréas	↗ de la prolifération et du pourcentage chez pré-diabétiques	↗ du phénotype Treg (ICOS, GITR, CTLA-4, CD25, Foxp3)	↗	
Tconv (CD4 ⁺ , Foxp3 ⁻)	systémique	(=)	(=)	↗ de la prolifération	↗ expression CD25
	ganglion drainant		↘ de la production d'IFN-γ.		↗ expression CD25, et production d'IFN-γ.
	pancréas		↘ de la production d'IFN-γ.		
LT CD8 ⁺	systémique	(=)		↘ du pourcentage	
	ganglion drainant	(=)	↘ de la production d'IFN-γ.	(=) du pourcentage mais de la ↗ de la prolifération	↗ expression CD25, IFN-γ.
	pancréas	légère ↗ de la prolifération mais pas de la proportion.	↘ de la production d'IFN-γ.		↗ expression CD25.
LB (B220 ⁺)	systémique	(=)	n.d.	(=)	n.d.
	ganglion drainant	(=)	n.d.	(=)	n.d.
	pancréas	(=)	n.d.	↗ de la prolifération	n.d.
NK (nkp46 ⁺ , CD3 ⁺)	systémique	légère ↗ du pourcentage	légère ↗ production d'IFN-γ	↗	pas d'effet observé
	ganglion drainant	(=)	(=)	↗	(=)
	pancréas	↗ de la proportion et de la prolifération	légère ↗ production d'IFN-γ	↗	↗ de la production IFN-γ.
CD11c ⁺	systémique	(=)	n.d.	↗ du pourcentage	n.d.
	ganglion drainant	(=)	n.d.		n.d.
	pancréas	(=)	n.d.		n.d.
CD11b ⁺ (CD11b, Ly6C ⁺ ; CD11b Ly6G ⁺)	systémique	(=) pour CD11b totaux	n.d.	↗ du pourcentage et de la prolifération	↗ des (CD11b, Ly6C ⁺ ; Ly6G ⁺)
	ganglion drainant	(=) pour CD11b totaux	n.d.		↗ des (CD11b, Ly6C ⁺)
	pancréas	(=) pour CD11b totaux	n.d.		↗ des (CD11b, Ly6C ⁺ ; Ly6G ⁺)

Tableau 8 : Récapitulatif de l'effet de l'IL-2 à différentes doses sur le système immunitaire chez la souris NOD.

présentent ni de diabète ni d'effet toxique ! Cette donnée remarquable laisse suggérer qu'une administration prolongée d'IL-2 a un effet tolérogène qui serait causé par la production d'anticorps anti IL-2.

D'un point de vue immunitaire, sous de fortes doses d'IL-2 nous observons l'effet inverse que celui observé avec de faibles doses. Sous de fortes doses d'IL-2, les LT pathogènes s'activent et produisent de fortes quantités d'IFN- γ . Cette augmentation d'IFN- γ pourrait être une des causes de la hausse de l'incidence du DT1. D'autre part nous avons constaté une augmentation des populations CD11b⁺ Ly6-C⁺ et CD11b⁺ Ly6-G⁺. Certains travaux indiquent que ces cellules pourraient avoir un effet initiateur du diabète (*Fu et al., 2012; Jansen et al., 1994*) alors que d'autres suggèrent qu'elles seraient plutôt protectrices (*Yin et al., 2010*). Dans ce cas précis, les Treg ne suffisent plus à contrôler l'activation du système immunitaire.

L'ensemble de ces données indiquent que la fenêtre thérapeutique de l'IL-2 reste petite et que selon la quantité d'IL-2 administrée les effets peuvent être opposés. Des résultats similaires ont été observés dans le cancer où selon la dose d'IL-2 injectée l'effet thérapeutique diverge (*Klapper et al., 2008*).

IV : Dans un contexte actuel, les thérapies par l'IL-2.

Chez l'homme, l'administration de faibles doses d'IL-2 dans la GvHD ou la vascularite associée à HCV permet une amélioration des signes cliniques. Ces résultats sont tous en corrélation avec une augmentation du taux des Treg. Parmi ces essais menés chez l'homme, une augmentation du nombre d'éosinophiles et/ou de NK a aussi été observée. Cependant cette augmentation n'affecte pas l'amélioration des signes cliniques. Dans l'essai mené pour contrôler la GvH, l'augmentation des NK et des éosinophiles est particulièrement prononcée lorsque l'IL-2 est administrée de façon quotidienne sur une longue période (*Koreth et al., 2011*). Alors que dans l'essai chez les patients atteints d'une vascularite à HCV où l'administration d'IL-2 était plus courte mais répétée, on ne retrouve pas d'augmentation des éosinophiles (*Saadoun et al., 2011*). Pour le diabète, il se pourrait aussi que l'efficacité du traitement résiderait en de courtes périodes d'injection répétées dans le temps plutôt que par des traitements de plusieurs semaines consécutives comme déjà effectués auparavant dans la GvH. Cette stratégie permettrait de limiter les effets secondaires. Par ailleurs un essai clinique

de phase I/II contre le DT1, visant à déterminer la dose d'IL-2 adéquate, vient juste d'être terminé (*NCT01353833*).

V : Vers des thérapies combinées.

Ces dernières années, dans le but d'améliorer les effets thérapeutiques, plusieurs études tentent de combiner les traitements (*van Belle et al., 2011*). Ainsi un essai clinique récent a combiné l'IL-2 et la rapamycine visant à stimuler les Treg et à contrôler les Tconv dans le DT1 (*Long et al., 2012*). La rapamycine seule permet la prévention du DT1 (*Baeder et al., 1992*). Ce traitement combiné avec l'IL-2 présente un effet synergique dans la prévention du DT1 (*Shapiro et al., 2002*). De même, dans un modèle expérimental de GvHD, la combinaison de l'IL-2 avec la rapamycine augmente le nombre des Treg (*Shin et al., 2011*). De plus, dans le cadre des greffes d'îlots la rapamycine permet la prévention du rejet du greffon (*Gagliani et al., 2011*).

A : Effet de la combinaison IL-2 rapamycine sur le système immunitaire (Figure 32).

Nous avons donc combiné chez la souris NOD un traitement par IL-2 à faible dose avec une courte cure de 5 jours de rapamycine. Or ce traitement n'induit aucune rémission du DT1 et, au contraire, la rapamycine inhibe l'effet curatif de l'IL-2. Afin de comprendre ce résultat surprenant nous avons dans un premier temps observé l'effet de la rapamycine sur le système immunitaire. L'administration de la rapamycine seule sur une courte durée tend à diminuer le pourcentage total de LT CD3⁺ de façon systémique mais pas au sein même du pancréas. Cette donnée indique qu'un traitement à court terme ne permet pas le nettoyage de l'infiltrat pancréatique comme observé avec un traitement prolongé (*Shapiro et al., 2002*). Chez les souris pré-diabétiques, l'IL-2 permet une augmentation du taux de Treg dans le pancréas. Cette augmentation est moindre lorsque l'IL-2 est combiné avec la rapamycine. Comme décrit précédemment l'IL-2 augmente aussi l'expression des marqueurs phénotypiques des Treg ; or sous traitement combiné cette hausse est diminuée. Cette donnée suggère que l'augmentation de l'activation des Treg est partiellement inhibée par la rapamycine. Ainsi les Treg présenteraient une activité suppressive altérée comme suggéré par le fait que la sécrétion d'IFN- γ produite par les LT CD8⁺ n'est pas réduite sous IL-2/rapamycine. De plus, la combinaison de l'IL-2 avec la rapamycine n'affecte pas l'augmentation des NK, induite par

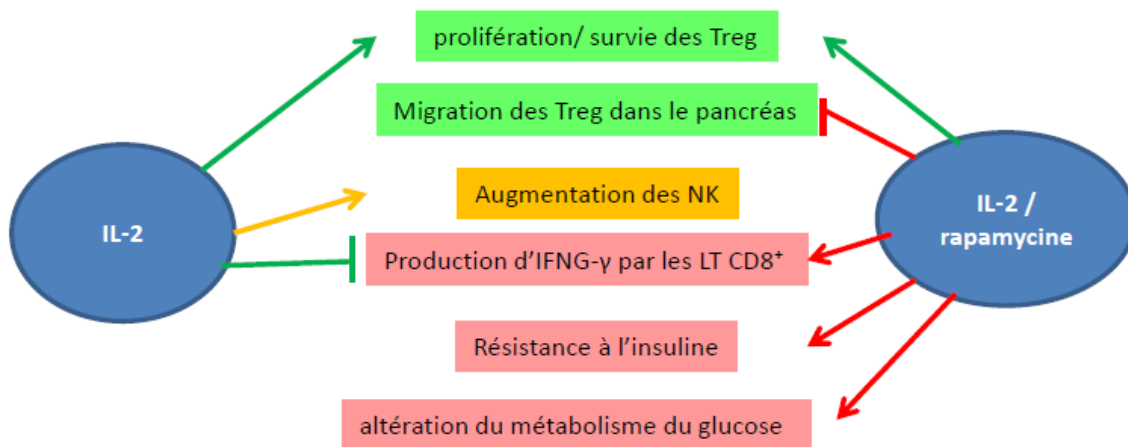


Figure 32. Schéma comparatif des effets de l'IL-2 en comparaison avec les effets de l'IL-2 combinée à la rapamycine dans le DT1 chez la NOD. Les flèches vertes et les cadrants verts sont en accord avec la rémission du DT1. Les flèches rouges ou les cadrants rouges favorisent la pathologie. On peut constater que l'administration d'IL-2 seule favorise l'expansion, la survie, et la fonction suppressive des Treg. Ils contrôlent aussi la production d'IFN-γ produit par les LT CD8⁺ infiltrant le pancréas. Toutefois l'IL-2 favorise aussi les NK qui semblent être réprimés par les Treg activés. Cette thérapie permet la rémission du DT1. La combinaison de l'IL-2 avec la rapamycine favorise elle aussi l'expansion et la survie des Treg mais semble perturber leur fonction suppressive et leur recrutement dans le pancréas. Ainsi la production d'IFN-γ par les LT CD8⁺ pathogènes n'est plus contrôlée. De plus ce traitement présente une toxicité pour les cellules β productrices d'insuline et perturbe le métabolisme du glucose.

l'IL-2. Des données similaires ont été obtenues à la périphérie chez l'homme (*Long et al., 2012*). Dans l'hypothèse que les NK ont un rôle pathologique, la rapamycine pourrait indirectement favoriser la pathogénèse en altérant la fonction des Treg sans affecter les NK. Ceci serait une des causes de l'effet néfaste de ce traitement.

Dans le but de confirmer l'hypothèse que la rapamycine inhibe l'effet curatif de l'IL-2, des souris diabétiques préalablement traitées par l'IL-2 et guéries ont été traitées avec la rapamycine. Après 3 à 10 jours de traitement avec la rapamycine, toutes les souris redeviennent diabétiques. Et de façon surprenante, la majorité de ces souris redeviennent normo-glycémiques dès l'arrêt du traitement à la rapamycine et sans l'administration d'IL-2. Cette expérience est la démonstration que la rapamycine inhibe l'effet de l'IL-2. D'ailleurs cet effet "réversible" de la rapamycine a été préalablement observé lors de la combinaison de la rapamycine avec l'anti-CD3 (*Valle et al., 2009*).

Une des hypothèses expliquant l'effet inhibiteur de la rapamycine sur le traitement à l'IL-2 serait que la rapamycine affecte le recrutement des Treg au sein du pancréas. En effet des travaux récents ont montré que la rapamycine influence la migration des LT CD8⁺ en favorisant l'expression de récepteurs de "homming" dans le ganglion tels que CD62L, CCR7 et S1P1 (*Finlay and Cantrell, 2010; Finlay et al., 2012*). Nous avons voulu vérifier cette hypothèse en étudiant l'expression de CCR7 sur les Treg présents dans les ganglions pancréatiques et infiltrant le pancréas. Cependant nous avons malheureusement été confrontés à des difficultés techniques. Lors de la purification des LT infiltrant le pancréas, les cellules sont en contact avec un grand nombre d'enzymes pancréatiques qui peuvent dégrader les récepteurs aux chimiokines. Toutefois, sous rapamycine le taux des Treg diminue dans le pancréas pour augmenter dans le ganglion pancréatique dans les souris guéries par l'IL-2. Lors de l'administration de rapamycine, ce taux tend à augmenter à nouveau dans le pancréas et à diminuer dans les ganglions drainants. Cette observation suggère de manière indirecte que la rapamycine influencerait la migration des Treg vers les organes lymphoïdes.

Ces résultats sont étonnants car d'un point de vue moléculaire la rapamycine inhibe la voie PI3K-Akt/ mTOR qui est peu utilisée par les Treg. En effet des travaux ont montré que les Treg expriment fortement la protéine PTEN, qui est un inhibiteur de cette voie (*Walsh et al., 2006*). L'ensemble des données précédentes indiquent que la rapamycine altère l'effet de l'IL-2 principalement sur les Treg. Sous IL-2 les Treg activent la voie de signalisation JAK/STAT5. L'étude de STAT5 phosphorylé dans les Treg *ex vivo*, après injection d'IL-2

seule ou combinée avec la rapamycine indique que la rapamycine n'empêche pas l'IL-2 d'activer cette voie dans les Treg.

B : La rapamycine a un rôle néfaste directement sur les îlots.

Des patients ayant subi une greffe du rein et qui sont traités chroniquement avec la rapamycine présentent un risque augmenté de développer un diabète lié à un dysfonctionnement du métabolisme du glucose associé à une résistance à l'insuline (*Johnston et al., 2008*). Pour ces raisons nous avons étudié l'effet de la rapamycine sur le métabolisme du glucose en effectuant des tests de tolérance au glucose et une analyse du transcriptome au niveau du foie. Nos données montrent que chez la souris NOD, la rapamycine induit une intolérance au glucose et perturbe le métabolisme du glucose au niveau hépatique. D'autre part la combinaison IL-2/rapamycine diminue la prolifération basale des cellules β productrices d'insuline. D'ailleurs *in vitro* des études menées sur les îlots humains ou sur des lignées cellulaires Min6 ont montré que la rapamycine présente une toxicité (*Lamming et al., 2012*). En effet d'un point de vue moléculaire, l'activation via la voie AKT/mTOR favorise le développement des cellules β et participe à la régulation du métabolisme de l'insuline. (*Cunningham et al., 2007*). Une autre étude a montré qu'une déficience en S6K1, un médiateur de la voie mTORC-1, induit une diminution de la quantité de cellules β et une hyperglycémie (*Pende et al., 2000*).

L'ensemble de ces études suggèrent que la rapamycine, principalement lorsqu'elle est combinée à l'IL-2 présente un effet néfaste sur les îlots pancréatiques résiduels dans les souris NOD, ce qui constituerait une explication plausible aux résultats négatifs de l'essai clinique.

VI: Vers de nouvelles thérapies.

L'IL-2 peut être couplée à d'autres molécules potentiellement curatives. Comme par exemple le G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor). Chez la souris NOD l'administration de G-CSF prévient du DT1 en mobilisant des pDC, qui induisent les iTreg, et en orientant les réponses Th1 vers un profil Th2 (*Kared et al., 2005*). Une étude a montré que le G-CSF couplé avec l'ATG améliore l'efficacité du traitement (*Parker et al., 2009*). D'ailleurs nos premiers résultats préliminaires montrent que les souris NOD présentant une glycémie supérieure à 350 mg/dl de sang peuvent guérir avec la combinaison de l'IL-2 et GCSF. On

pourrait aussi envisager d'administrer l'IL-2 avec le TNF ; cependant il faudrait considérer ce traitement avec beaucoup de précaution car une faible injection de TNF chez la souris NOD augmente les Treg mais aussi les LT pathogènes (nos données personnelles, (*Wu et al., 2002*).

Enfin on peut envisager de nouvelles thérapies en ciblant à la fois l'attaque auto-immune et en favorisant la régénération et la prolifération des cellules β résiduelles. Par exemple, une étude récente a démontré que l'ajout d'un micro ARN mir7 favorise la prolifération des cellules β) (*Wang et al., 2013*).

VII : Appréciation personnelle.

Mon travail de thèse a permis d'identifier une nouvelle molécule curative du DT1 chez la souris NOD, l'IL-2. Cependant cette cytokine a un rôle pléiotrope et peut avoir à la fois une action immuno-régulatrice ou immuno-stimulatrice selon la dose administrée. Chez l'homme un essai clinique a montré que la combinaison de l'IL-2 avec la rapamycine ne fonctionne pas dans le DT1. Ces résultats sont en corrélation avec mes travaux. Ceci montre l'intérêt de tester de nouvelles thérapies chez la souris avant l'homme. L'avantage de ce modèle est qu'il permet d'apprécier de façon plus précise l'effet d'un traitement au niveau de l'organe cible, le pancréas ; et dans notre cas d'apporter quelques explications sur l'effet néfaste de la rapamycine couplée à l'IL-2 dans le DT1.

Actuellement l'IL-2 est testée sous différentes formulations et dans différentes pathologies telles que les cancers, la GvH, la vascularite à HCV, l'infection VIH ou le diabète autoimmun. Malgré le grand potentiel thérapeutique que représente l'IL-2, il faut considérer ce traitement avec beaucoup de précaution car il peut présenter des effets secondaires importants.

- Dans les cancers, l'injection de fortes doses d'IL-2 seule permet de stimuler la réponse immune anti cancéreuse et améliore la survie des patients, mais ne permet pas l'éradication des tumeurs (*Smith et al., 2008*). Toutefois, ce traitement peut aussi augmenter les lymphocytes Treg limitant son effet sur la tumeur et surtout présente des effets secondaires importants comme le « vascular leak syndrome » (VSL), une baisse de la tension ou encore le risque d'œdème pulmonaire. De plus on pourrait supposer que ce traitement à l'IL-2 puisse diminuer les réponses immunitaires contre des agents pathogènes exogènes.

- Dans la prévention de la GvH, l'étude de modèles murins montre que l'injection de fortes doses d'IL-2 présente un effet bénéfique (*Sykes et al., 1990*). Inversement,

l'administration de faibles doses d'IL-2 ne permet pas la prévention de la GvH aigue dans un autre modèle murin (*Martin et al "soumis"*). Chez l'homme, un premier essai clinique montre une amélioration des signes de la GvH associée à une augmentation des Treg, mais aussi une augmentation des NK et des éosinophiles chez les patients ayant reçu les plus fortes doses (*Matsuoka et al., 2013*).

- Dans la vascularite associée à HCV, le traitement à de plus faibles doses d'IL-2 sur de courtes durées et de façon répétée montre une amélioration des signes cliniques associée à une augmentation des Treg. Toutefois ce traitement n'a pas fonctionné chez tout les patients traités et une augmentation des NK a aussi été observée (*Saadoun et al., 2011*). L'ensemble de ces travaux montrent que selon la maladie et la quantité d'IL-2 administrée, l'effet thérapeutique est variable.

L'IL-2 a une demi-vie faible (environ 30 min) ; dans le but d'améliorer sa durée de vie, elle a été couplée avec un anticorps anti-IL-2 non neutralisant. Il existe plusieurs complexes avec des effets différents, certains favoriseraient l'expansion des Treg et d'autres plutôt des Tconv.

L'un d'entre eux, l'IL-2-S4B6, est connu pour favoriser la réponse immune anti tumorale ou anti virale dans les modèles murins (*Boyman et al., 2006*). De plus, ce complexe présenterait des effets secondaires atténués et limiterait la prolifération des Treg.

Un autre complexe, IL-2-JES6-1 connu pour stimuler les Treg présente un effet bénéfique dans de nombreuses maladies. Par exemple il prévient le diabète chez la souris NOD (*Tang et al., 2008*) mais aussi l'EAE, le rejet de greffe d'îlots (*Webster et al., 2009*).ou encore l'athérosclérose (*Dinh et al., 2012*). Toutefois ce traitement ne permet pas de prévenir le rejet de greffe de peau malgré une augmentation des Treg (*Vokaer et al., 2012*).

Notons que dans la plupart de ces études, les effets secondaires comme l'augmentation des NK et le risque d'oedème n'ont pas toujours été évalués.

Enfin, nous avons abordé le fait que le traitement combiné de l'IL-2 avec la rapamycine ne fonctionne pas chez la souris NOD. En revanche, chez la souris, celui-ci présente un effet bénéfique dans la greffe d'îlots pancréatiques ou encore dans la GVH (*Shin et al., 2011*). Chez l'homme, un essai clinique est actuellement en cours dans la GvH.

Cette liste non exhaustive des différents traitements en relation avec l'IL-2 montre des résultats différents selon la maladie, la quantité et le type d'IL-2 administré. Ceci montre qu'il est nécessaire pour les thérapies futures d'étudier plus en détail les bénéfices/ risques de ce traitement et son intérêt. De plus nos résultats chez la souris mettent en avant le besoin d'étudier plus en détail les effets inappropriés de l'IL-2 ou de la rapamycine dans les essais cliniques à venir.

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abrams, D., Y. Levy, M.H. Losso, A. Babiker, G. Collins, D.A. Cooper, J. Darbyshire, S. Emery, L. Fox, F. Gordin, H.C. Lane, J.D. Lundgren, R. Mitsuyasu, J.D. Neaton, A. Phillips, J.P. Routy, G. Tambussi, and D. Wentworth. 2009. Interleukin-2 therapy in patients with HIV infection. *The New England journal of medicine* 361:1548-1559.
- Abrams, J.R., M.G. Lebowitz, C.A. Guzzo, B.V. Jegasothy, M.T. Goldfarb, B.S. Goffe, A. Menter, N.J. Lowe, G. Krueger, M.J. Brown, R.S. Weiner, M.J. Birkhofer, G.L. Warner, K.K. Berry, P.S. Linsley, J.G. Krueger, H.D. Ochs, S.L. Kelley, and S. Kang. 1999. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *The Journal of clinical investigation* 103:1243-1252.
- Agardh, C.D., C.M. Cilio, A. Lethagen, K. Lynch, R.D. Leslie, M. Palmer, R.A. Harris, J.A. Robertson, and A. Lernmark. 2005. Clinical evidence for the safety of GAD65 immunomodulation in adult-onset autoimmune diabetes. *Journal of diabetes and its complications* 19:238-246.
- Agata, Y., A. Kawasaki, H. Nishimura, Y. Ishida, T. Tsubata, H. Yagita, and T. Honjo. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *International immunology* 8:765-772.
- Aggarwal, B.B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* 3:745-756.
- Aggarwal, B.B., S.C. Gupta, and J.H. Kim. 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119:651-665.
- Ahmadzadeh, M., and S.A. Rosenberg. 2006. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood* 107:2409-2414.
- Alba, A., R. Planas, X. Clemente, J. Carrillo, R. Ampudia, M.C. Puertas, X. Pastor, E. Tolosa, R. Pujol-Borrell, J. Verdager, and M. Vives-Pi. 2008. Natural killer cells are required for accelerated type 1 diabetes driven by interferon-beta. *Clinical and experimental immunology* 151:467-475.
- Allan, S.E., S.Q. Crome, N.K. Crellin, L. Passerini, T.S. Steiner, R. Bacchetta, M.G. Roncarolo, and M.K. Levings. 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International immunology* 19:345-354.
- Almeida, A.R., N. Legrand, M. Papiernik, and A.A. Freitas. 2002. Homeostasis of peripheral CD4⁺ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4⁺ T cell numbers. *J Immunol* 169:4850-4860.
- Almeida, A.R., B. Zaragoza, and A.A. Freitas. 2006. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol* 177:192-200.
- Aly, T.A., A. Ide, M.M. Jahromi, J.M. Barker, M.S. Fernando, S.R. Babu, L. Yu, D. Miao, H.A. Erlich, P.R. Fain, K.J. Barriga, J.M. Norris, M.J. Rewers, and G.S. Eisenbarth. 2006. Extreme genetic risk for type 1A diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:14074-14079.
- Amrani, A., J. Verdager, S. Thiessen, S. Bou, and P. Santamaria. 2000. IL-1alpha, IL-1beta, and IFN-gamma mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4(+) T lymphocytes. *The Journal of clinical investigation* 105:459-468.
- Anderson, M.S., E.S. Venanzi, L. Klein, Z. Chen, S.P. Berzins, S.J. Turley, H. von Boehmer, R. Bronson, A. Dierich, C. Benoist, and D. Mathis. 2002. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science* 298:1395-1401.
- Ansari, M.J., A.D. Salama, T. Chitnis, R.N. Smith, H. Yagita, H. Akiba, T. Yamazaki, M. Azuma, H. Iwai, S.J. Khoury, H. Auchincloss, Jr., and M.H. Sayegh. 2003. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *The Journal of experimental medicine* 198:63-69.
- Antin, J.H., H.T. Kim, C. Cutler, V.T. Ho, S.J. Lee, D.B. Miklos, E.P. Hochberg, C.J. Wu, E.P. Alyea, and R.J. Soiffer. 2003. Sirolimus, tacrolimus, and low-dose methotrexate for graft-versus-host disease prophylaxis in mismatched related donor or unrelated donor transplantation. *Blood* 102:1601-1605.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Apostolou, I., A. Sarukhan, L. Klein, and H. von Boehmer. 2002. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nature immunology* 3:756-763.
- Apostolou, I., and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *The Journal of experimental medicine* 199:1401-1408.
- Arnush, M., A.L. Scarim, M.R. Heitmeier, C.B. Kelly, and J.A. Corbett. 1998. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 160:2684-2691.
- Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi, and S. Sakaguchi. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *The Journal of experimental medicine* 184:387-396.
- Assier, E., V. Jullien, J. Lefort, J.L. Moreau, J.P. Di Santo, B.B. Vargaftig, J.R. Lapa e Silva, and J. Theze. 2004. NK cells and polymorphonuclear neutrophils are both critical for IL-2-induced pulmonary vascular leak syndrome. *J Immunol* 172:7661-7668.
- Atarashi, K., T. Tanoue, T. Shima, A. Imaoka, T. Kuwahara, Y. Momose, G. Cheng, S. Yamasaki, T. Saito, Y. Ohba, T. Taniguchi, K. Takeda, S. Hori, Ivanov, II, Y. Umesaki, K. Itoh, and K. Honda. 2011. Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331:337-341.
- Aumeunier, A., F. Grela, A. Ramadan, L. Pham Van, E. Bardel, A. Gomez Alcala, P. Jeannin, S. Akira, J.F. Bach, and N. Thieblemont. 2010. Systemic Toll-like receptor stimulation suppresses experimental allergic asthma and autoimmune diabetes in NOD mice. *PloS one* 5:e11484.
- Awasthi, A., Y. Carrier, J.P. Peron, E. Bettelli, M. Kamanaka, R.A. Flavell, V.K. Kuchroo, M. Oukka, and H.L. Weiner. 2007. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nature immunology* 8:1380-1389.
- Bacchetta, R., M. Bigler, J.L. Touraine, R. Parkman, P.A. Tovo, J. Abrams, R. de Waal Malefyt, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1994. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine* 179:493-502.
- Bach, J.F. 2002. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *The New England journal of medicine* 347:911-920.
- Bach, J.F., and L. Chatenoud. 2012. The hygiene hypothesis: an explanation for the increased frequency of insulin-dependent diabetes. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2:a007799.
- Baecher-Allan, C., J.A. Brown, G.J. Freeman, and D.A. Hafler. 2001. CD4+CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 167:1245-1253.
- Baeder, W.L., J. Sredy, S.N. Sehgal, J.Y. Chang, and L.M. Adams. 1992. Rapamycin prevents the onset of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice. *Clinical and experimental immunology* 89:174-178.
- Balato, A., D. Unutmaz, and A.A. Gaspari. 2009. Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions. *The Journal of investigative dermatology* 129:1628-1642.
- Baluna, R., J. Rizo, B.E. Gordon, V. Ghetie, and E.S. Vitetta. 1999. Evidence for a structural motif in toxins and interleukin-2 that may be responsible for binding to endothelial cells and initiating vascular leak syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:3957-3962.
- Baluna, R., and E.S. Vitetta. 1997. Vascular leak syndrome: a side effect of immunotherapy. *Immunopharmacology* 37:117-132.
- Bandyopadhyay, S., N. Soto-Nieves, and F. Macian. 2007. Transcriptional regulation of T cell tolerance. *Seminars in immunology* 19:180-187.
- Bar-On, L., T. Birnberg, K.W. Kim, and S. Jung. 2011. Dendritic cell-restricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation. *European journal of immunology* 41:291-298.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Barrett, J.C., D.G. Clayton, P. Concannon, B. Akolkar, J.D. Cooper, H.A. Erlich, C. Julier, G. Morahan, J. Nerup, C. Nierras, V. Plagnol, F. Pociot, H. Schuilenburg, D.J. Smyth, H. Stevens, J.A. Todd, N.M. Walker, and S.S. Rich. 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature genetics* 41:703-707.
- Barron, L., H. Dooks, K.K. Hoyer, W. Kuswanto, J. Hofmann, W.E. O'Gorman, and A.K. Abbas. 2010. Cutting edge: mechanisms of IL-2-dependent maintenance of functional regulatory T cells. *J Immunol* 185:6426-6430.
- Battaglia, M., and M.G. Roncarolo. 2011. Immune intervention with T regulatory cells: past lessons and future perspectives for type 1 diabetes. *Seminars in immunology* 23:182-194.
- Battaglia, M., A. Stabilini, E. Draghici, S. Gregori, C. Mocchetti, E. Bonifacio, and M.G. Roncarolo. 2006a. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* 55:40-49.
- Battaglia, M., A. Stabilini, B. Migliavacca, J. Horejs-Hoeck, T. Kaupper, and M.G. Roncarolo. 2006b. Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Immunol* 177:8338-8347.
- Bautista, J.L., C.W. Lio, S.K. Lathrop, K. Forbush, Y. Liang, J. Luo, A.Y. Rudensky, and C.S. Hsieh. 2009. Intracolon competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus. *Nature immunology* 10:610-617.
- Bayer, A.L., J.Y. Lee, A. de la Barrera, C.D. Surh, and T.R. Malek. 2008. A function for IL-7R for CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 181:225-234.
- Bayer, A.L., A. Yu, and T.R. Malek. 2007. Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178:4062-4071.
- Beaudoin, L., V. Laloux, J. Novak, B. Lucas, and A. Lehuen. 2002. NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 17:725-736.
- Beilke, J.N., N.R. Kuhl, L. Van Kaer, and R.G. Gill. 2005. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nature medicine* 11:1059-1065.
- Beilke, J.N., C.T. Meagher, K. Hosiawa, M. Champsaur, J.A. Bluestone, and L.L. Lanier. 2012. NK cells are not required for spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice. *PloS one* 7:e36011.
- Belghith, M., J.A. Bluestone, S. Barriot, J. Megret, J.F. Bach, and L. Chatenoud. 2003. TGF-beta-dependent mechanisms mediate restoration of self-tolerance induced by antibodies to CD3 in overt autoimmune diabetes. *Nature medicine* 9:1202-1208.
- Belkaid, Y., and K. Tarbell. 2009. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annual review of immunology* 27:551-589.
- Bennett, S.T., A.M. Lucassen, S.C. Gough, E.E. Powell, D.E. Undlien, L.E. Pritchard, M.E. Merriman, Y. Kawaguchi, M.J. Dronsfield, F. Pociot, and et al. 1995. Susceptibility to human type 1 diabetes at IDDM2 is determined by tandem repeat variation at the insulin gene minisatellite locus. *Nature genetics* 9:284-292.
- Bensinger, S.J., A. Bandeira, M.S. Jordan, A.J. Caton, and T.M. Laufer. 2001. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 194:427-438.
- Bensinger, S.J., P.T. Walsh, J. Zhang, M. Carroll, R. Parsons, J.C. Rathmell, C.B. Thompson, M.A. Burchill, M.A. Farrar, and L.A. Turka. 2004. Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5287-5296.
- Beyersdorf, N., S. Gaupp, K. Balbach, J. Schmidt, K.V. Toyka, C.H. Lin, T. Hanke, T. Hunig, T. Kerkau, and R. Gold. 2005. Selective targeting of regulatory T cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 202:445-455.

- Bielekova, B., M. Catalfamo, S. Reichert-Scriver, A. Packer, M. Cerna, T.A. Waldmann, H. McFarland, P.A. Henkart, and R. Martin. 2006. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:5941-5946.
- Billiard, F., E. Litvinova, D. Saadoun, F. Djelti, D. Klatzmann, J.L. Cohen, G. Marodon, and B.L. Salomon. 2006. Regulatory and effector T cell activation levels are prime determinants of in vivo immune regulation. *J Immunol* 177:2167-2174.
- Birnberg, T., L. Bar-On, A. Sapoznikov, M.L. Caton, L. Cervantes-Barragan, D. Makia, R. Krauthgamer, O. Brenner, B. Ludewig, D. Brockschneider, D. Riethmacher, B. Reizis, and S. Jung. 2008. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity* 29:986-997.
- Blache, C., T. Lequerre, A. Roucheux, S. Beutheu, I. Dedreux, S. Jacquot, X. Le Loet, O. Boyer, and O. Vittecoq. 2011. Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4+CD25hi regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. *Rheumatology (Oxford)* 50:1814-1822.
- Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
- Blair, P.A., L.Y. Norena, F. Flores-Borja, D.J. Rawlings, D.A. Isenberg, M.R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 32:129-140.
- Bodor, J., L. Feigenbaum, J. Bodorova, C. Bare, M.S. Reitz, Jr., and R.E. Gress. 2001. Suppression of T-cell responsiveness by inducible cAMP early repressor (ICER). *Journal of leukocyte biology* 69:1053-1059.
- Boissonnas, A., A. Scholer-Dahirel, V. Simon-Blancal, L. Pace, F. Valet, A. Kissenpfennig, T. Sparwasser, B. Malissen, L. Fetler, and S. Amigorena. 2010. Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32:266-278.
- Bolt, S., E. Routledge, I. Lloyd, L. Chatenoud, H. Pope, S.D. Gorman, M. Clark, and H. Waldmann. 1993. The generation of a humanized, non-mitogenic CD3 monoclonal antibody which retains in vitro immunosuppressive properties. *European journal of immunology* 23:403-411.
- Bonomo, A., P.J. Kehn, E. Payer, L. Rizzo, A.W. Cheever, and E.M. Shevach. 1995. Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells. *J Immunol* 154:6602-6611.
- Bopp, T., C. Becker, M. Klein, S. Klein-Hessling, A. Palmethofer, E. Serfling, V. Heib, M. Becker, J. Kubach, S. Schmitt, S. Stoll, H. Schild, M.S. Staeger, M. Stassen, H. Jonuleit, and E. Schmitt. 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of experimental medicine* 204:1303-1310.
- Bosma, A., A. Abdel-Gadir, D.A. Isenberg, E.C. Jury, and C. Mauri. 2012. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* 36:477-490.
- Bottini, N., L. Musumeci, A. Alonso, S. Rahmouni, K. Nika, M. Rostamkhani, J. MacMurray, G.F. Meloni, P. Lucarelli, M. Pellecchia, G.S. Eisenbarth, D. Comings, and T. Mustelin. 2004. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nature genetics* 36:337-338.
- Bottini, N., T. Vang, F. Cucca, and T. Mustelin. 2006. Role of PTPN22 in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. *Seminars in immunology* 18:207-213.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bouaziz, J.D., K. Yanaba, and T.F. Tedder. 2008. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunological reviews* 224:201-214.
- Bouaziz, J.D., K. Yanaba, G.M. Venturi, Y. Wang, R.M. Tisch, J.C. Poe, and T.F. Tedder. 2007. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:20878-20883.
- Bouneaud, C., P. Kourilsky, and P. Bousso. 2000. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13:829-840.
- Boyman, O., M. Kovar, M.P. Rubinstein, C.D. Surh, and J. Sprent. 2006. Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes. *Science* 311:1924-1927.
- Boyman, O., and J. Sprent. 2012. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature reviews. Immunology* 12:180-190.
- Bradley, L.M., V.C. Asensio, L.K. Schioetz, J. Harbertson, T. Krah, G. Patstone, N. Woolf, I.L. Campbell, and N. Sarvetnick. 1999. Islet-specific Th1, but not Th2, cells secrete multiple chemokines and promote rapid induction of autoimmune diabetes. *J Immunol* 162:2511-2520.
- Brinster, C., and E.M. Shevach. 2008. Costimulatory effects of IL-1 on the expansion/differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ and CD4+CD25+Foxp3- T cells. *Journal of leukocyte biology* 84:480-487.
- Brodie, G.M., M. Wallberg, P. Santamaria, F.S. Wong, and E.A. Green. 2008. B-cells promote intra-islet CD8+ cytotoxic T-cell survival to enhance type 1 diabetes. *Diabetes* 57:909-917.
- Bronte, V., and P. Zanovello. 2005. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nature reviews. Immunology* 5:641-654.
- Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paep, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics* 27:68-73.
- Burchill, M.A., J. Yang, K.B. Vang, J.J. Moon, H.H. Chu, C.W. Lio, A.L. Vegoe, C.S. Hsieh, M.K. Jenkins, and M.A. Farrar. 2008. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* 28:112-121.
- Burchill, M.A., J. Yang, C. Vogtenhuber, B.R. Blazar, and M.A. Farrar. 2007. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 178:280-290.
- Cantor, J., and K. Haskins. 2007. Recruitment and activation of macrophages by pathogenic CD4 T cells in type 1 diabetes: evidence for involvement of CCR8 and CCL1. *J Immunol* 179:5760-5767.
- Cao, X., S.F. Cai, T.A. Fehniger, J. Song, L.I. Collins, D.R. Piwnica-Worms, and T.J. Ley. 2007. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635-646.
- Carboni, S., F. Aboul-Enein, C. Waltzinger, N. Killeen, H. Lassmann, and C. Pena-Rossi. 2003. CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 145:1-11.
- Carrier, Y., M.J. Whitters, J.S. Miyashiro, T.P. LaBranche, H.E. Ramon, S.E. Benoit, M.S. Ryan, S.P. Keegan, H. Guay, J. Douhan, M. Collins, K. Dunussi-Joannopoulos, and Q.G. Medley. 2012. Enhanced GITR/GITRL interactions augment IL-27 expression and induce IL-10-producing Tr-1 like cells. *European journal of immunology* 42:1393-1404.
- Carter, N.A., R. Vasconcellos, E.C. Rosser, C. Tulone, A. Munoz-Suano, M. Kamanaka, M.R. Ehrenstein, R.A. Flavell, and C. Mauri. 2011. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J Immunol* 186:5569-5579.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cederbom, L., H. Hall, and F. Ivars. 2000. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *European journal of immunology* 30:1538-1543.
- Chappert, P., and R.H. Schwartz. 2010. Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Current opinion in immunology* 22:552-559.
- Chaput, N., S. Louafi, A. Bardier, F. Charlotte, J.C. Vaillant, F. Menegaux, M. Rosenzweig, F. Lemoine, D. Klatzmann, and J. Taieb. 2009. Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 58:520-529.
- Chatenoud, L., and J.F. Bach. 2005. Resetting the functional capacity of regulatory T cells: a novel immunotherapeutic strategy to promote immune tolerance. *Expert opinion on biological therapy* 5 Suppl 1:S73-81.
- Chatenoud, L., and J.A. Bluestone. 2007. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* 7:622-632.
- Chatenoud, L., E. Thervet, J. Primo, and J.F. Bach. 1994. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:123-127.
- Chatterjee, N.K., J. Hou, P. Dockstader, and T. Charbonneau. 1992. Coxsackievirus B4 infection alters thymic, splenic, and peripheral lymphocyte repertoire preceding onset of hyperglycemia in mice. *Journal of medical virology* 38:124-131.
- Chaudhry, A., D. Rudra, P. Treuting, R.M. Samstein, Y. Liang, A. Kas, and A.Y. Rudensky. 2009. CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science* 326:986-991.
- Chaudhry, A., R.M. Samstein, P. Treuting, Y. Liang, M.C. Pils, J.M. Heinrich, R.S. Jack, F.T. Wunderlich, J.C. Bruning, W. Muller, and A.Y. Rudensky. 2011. Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation. *Immunity* 34:566-578.
- Chen, L., and D.B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews. Immunology* 13:227-242.
- Chen, X., M. Baumel, D.N. Mannel, O.M. Howard, and J.J. Oppenheim. 2007. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* 179:154-161.
- Chen, X., R. Hamano, J.J. Subleski, A.A. Hurwitz, O.M. Howard, and J.J. Oppenheim. 2010a. Expression of costimulatory TNFR2 induces resistance of CD4+FoxP3- conventional T cells to suppression by CD4+FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* 185:174-182.
- Chen, X., J.J. Subleski, R. Hamano, O.M. Howard, R.H. Wiltrot, and J.J. Oppenheim. 2010b. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *European journal of immunology* 40:1099-1106.
- Chen, X., J.J. Subleski, H. Kopf, O.M. Howard, D.N. Mannel, and J.J. Oppenheim. 2008. Cutting edge: expression of TNFR2 defines a maximally suppressive subset of mouse CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells: applicability to tumor-infiltrating T regulatory cells. *J Immunol* 180:6467-6471.
- Chen, X., X. Wu, Q. Zhou, O.M. Howard, M.G. Netea, and J.J. Oppenheim. 2013. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol* 190:1076-1084.
- Chen, Y., S. Shen, B.K. Gorenz, J. Gao, and X.P. Zhong. 2012. Murine regulatory T cells contain hyperproliferative and death-prone subsets with differential ICOS expression. *J Immunol* 188:1698-1707.
- Chiba, K., H. Matsuyuki, Y. Maeda, and K. Sugahara. 2006. Role of sphingosine 1-phosphate receptor type 1 in lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus. *Cellular & molecular immunology* 3:11-19.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chinen, T., P.Y. Volchkov, A.V. Chervonsky, and A.Y. Rudensky. 2010. A critical role for regulatory T cell-mediated control of inflammation in the absence of commensal microbiota. *The Journal of experimental medicine* 207:2323-2330.
- Choi, B.K., J.S. Bae, E.M. Choi, W.J. Kang, S. Sakaguchi, D.S. Vinay, and B.S. Kwon. 2004. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4+CD25+ T cells. *Journal of leukocyte biology* 75:785-791.
- Chong, M.M., J.P. Rasmussen, A.Y. Rudensky, and D.R. Littman. 2008. The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *The Journal of experimental medicine* 205:2005-2017.
- Christen, U., D. Benke, T. Wolfe, E. Rodrigo, A. Rhode, A.C. Hughes, M.B. Oldstone, and M.G. von Herrath. 2004. Cure of prediabetic mice by viral infections involves lymphocyte recruitment along an IP-10 gradient. *The Journal of clinical investigation* 113:74-84.
- Christianson, S.W., L.D. Shultz, and E.H. Leiter. 1993. Adoptive transfer of diabetes into immunodeficient NOD-scid/scid mice. Relative contributions of CD4+ and CD8+ T-cells from diabetic versus prediabetic NOD.NON-Thy-1a donors. *Diabetes* 42:44-55.
- Chung, Y., S. Tanaka, F. Chu, R.I. Nurieva, G.J. Martinez, S. Rawal, Y.H. Wang, H. Lim, J.M. Reynolds, X.H. Zhou, H.M. Fan, Z.M. Liu, S.S. Neelapu, and C. Dong. 2011. Follicular regulatory T cells expressing Foxp3 and Bcl-6 suppress germinal center reactions. *Nature medicine* 17:983-988.
- Cipolletta, D., M. Feuerer, A. Li, N. Kamei, J. Lee, S.E. Shoelson, C. Benoist, and D. Mathis. 2012. PPAR-gamma is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue Treg cells. *Nature* 486:549-553.
- Cobb, B.S., A. Hertweck, J. Smith, E. O'Connor, D. Graf, T. Cook, S.T. Smale, S. Sakaguchi, F.J. Livesey, A.G. Fisher, and M. Merkenschlager. 2006. A role for Dicer in immune regulation. *The Journal of experimental medicine* 203:2519-2527.
- Coenen, J.J., H.J. Koenen, E. van Rijssen, A. Kasran, L. Boon, L.B. Hilbrands, and I. Joosten. 2007. Rapamycin, not cyclosporine, permits thymic generation and peripheral preservation of CD4+CD25+ FoxP3+ T cells. *Bone marrow transplantation* 39:537-545.
- Cohen, A.D., D.A. Schaer, C. Liu, Y. Li, D. Hirschhorn-Cymerman, S.C. Kim, A. Diab, G. Rizzuto, F. Duan, M.A. Perales, T. Merghoub, A.N. Houghton, and J.D. Wolchok. 2010. Agonist anti-GITR monoclonal antibody induces melanoma tumor immunity in mice by altering regulatory T cell stability and intra-tumor accumulation. *PloS one* 5:e10436.
- Collins, A.V., D.W. Brodie, R.J. Gilbert, A. Iaboni, R. Manso-Sancho, B. Walse, D.I. Stuart, P.A. van der Merwe, and S.J. Davis. 2002. The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17:201-210.
- Collins, C.B., C.M. Aherne, E.N. McNamee, M.D. Lebsack, H. Eltzschig, P. Jedlicka, and J. Rivera-Nieves. 2012. Flt3 ligand expands CD103(+) dendritic cells and FoxP3(+) T regulatory cells, and attenuates Crohn's-like murine ileitis. *Gut* 61:1154-1162.
- Collison, L.W., C.J. Workman, T.T. Kuo, K. Boyd, Y. Wang, K.M. Vignali, R. Cross, D. Sehy, R.S. Blumberg, and D.A. Vignali. 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450:566-569.
- Concannon, P., S.S. Rich, and G.T. Nepom. 2009. Genetics of type 1A diabetes. *The New England journal of medicine* 360:1646-1654.
- Conrad, C., J. Gregorio, Y.H. Wang, T. Ito, S. Meller, S. Hanabuchi, S. Anderson, N. Atkinson, P.T. Ramirez, Y.J. Liu, R. Freedman, and M. Gilliet. 2012. Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells. *Cancer research* 72:5240-5249.
- Coombes, J.L., K.R. Siddiqui, C.V. Arancibia-Carcamo, J. Hall, C.M. Sun, Y. Belkaid, and F. Powrie. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine* 204:1757-1764.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Cooper, J.D., D.J. Smyth, A.M. Smiles, V. Plagnol, N.M. Walker, J.E. Allen, K. Downes, J.C. Barrett, B.C. Healy, J.C. Mychaleckyj, J.H. Warram, and J.A. Todd. 2008. Meta-analysis of genome-wide association study data identifies additional type 1 diabetes risk loci. *Nature genetics* 40:1399-1401.
- Cosgrove, D., S.H. Chan, C. Waltzinger, C. Benoist, and D. Mathis. 1992. The thymic compartment responsible for positive selection of CD4+ T cells. *International immunology* 4:707-710.
- Cotran, R.S., J.S. Pober, M.A. Gimbrone, Jr., T.A. Springer, E.A. Wiebke, A.A. Gaspari, S.A. Rosenberg, and M.T. Lotze. 1988. Endothelial activation during interleukin 2 immunotherapy. A possible mechanism for the vascular leak syndrome. *J Immunol* 140:1883-1888.
- Cretney, E., A. Xin, W. Shi, M. Minnich, F. Masson, M. Miasari, G.T. Belz, G.K. Smyth, M. Busslinger, S.L. Nutt, and A. Kallies. 2011. The transcription factors Blimp-1 and IRF4 jointly control the differentiation and function of effector regulatory T cells. *Nature immunology* 12:304-311.
- Cruzado, J.M., O. Bestard, and J.M. Grinyo. 2009. New immunosuppressive protocols with the advent of novel biological drugs. *Transplantation* 88:S20-23.
- Cuffy, M.C., A.M. Silverio, L. Qin, Y. Wang, R. Eid, G. Brandacher, F.G. Lakkis, D. Fuchs, J.S. Pober, and G. Tellides. 2007. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in vascular smooth muscle cells by interferon-gamma contributes to medial immunoprivilege. *J Immunol* 179:5246-5254.
- Cunningham, J.T., J.T. Rodgers, D.H. Arlow, F. Vazquez, V.K. Mootha, and P. Puigserver. 2007. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 450:736-740.
- Curotto de Lafaille, M.A., N. Kutchukhidze, S. Shen, Y. Ding, H. Yee, and J.J. Lafaille. 2008. Adaptive Foxp3+ regulatory T cell-dependent and -independent control of allergic inflammation. *Immunity* 29:114-126.
- Cutler, C., S. Li, V.T. Ho, J. Koreth, E. Alyea, R.J. Soiffer, and J.H. Antin. 2007. Extended follow-up of methotrexate-free immunosuppression using sirolimus and tacrolimus in related and unrelated donor peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* 109:3108-3114.
- Cuzzocrea, S., G. Nocentini, R. Di Paola, M. Agostini, E. Mazzon, S. Ronchetti, C. Crisafulli, E. Esposito, A.P. Caputi, and C. Riccardi. 2006. Proinflammatory role of glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene in acute lung inflammation. *J Immunol* 177:631-641.
- D'Alise, A.M., V. Auyeung, M. Feuerer, J. Nishio, J. Fontenot, C. Benoist, and D. Mathis. 2008. The defect in T-cell regulation in NOD mice is an effect on the T-cell effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:19857-19862.
- Dahlen, E., K. Dawe, L. Ohlsson, and G. Hedlund. 1998. Dendritic cells and macrophages are the first and major producers of TNF-alpha in pancreatic islets in the nonobese diabetic mouse. *J Immunol* 160:3585-3593.
- Daissormont, I.T., A. Christ, L. Temmerman, S. Sampedro Millares, T. Seijkens, M. Manca, M. Rousch, M. Poggi, L. Boon, C. van der Loos, M. Daemen, E. Lutgens, B. Halvorsen, P. Aukrust, E. Janssen, and E.A. Biessen. 2011. Plasmacytoid dendritic cells protect against atherosclerosis by tuning T-cell proliferation and activity. *Circulation research* 109:1387-1395.
- Damjanovich, S., L. Bene, J. Matko, A. Alileche, C.K. Goldman, S. Sharrow, and T.A. Waldmann. 1997. Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:13134-13139.

- Dang, E.V., J. Barbi, H.Y. Yang, D. Jinasena, H. Yu, Y. Zheng, Z. Bordman, J. Fu, Y. Kim, H.R. Yen, W. Luo, K. Zeller, L. Shimoda, S.L. Topalian, G.L. Semenza, C.V. Dang, D.M. Pardoll, and F. Pan. 2011. Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146:772-784.
- Danso-Abeam, D., S. Humblet-Baron, J. Dooley, and A. Liston. 2011. Models of aire-dependent gene regulation for thymic negative selection. *Frontiers in immunology* 2:14.
- Darrasse-Jeze, G., A.S. Bergot, A. Durgeau, F. Billiard, B.L. Salomon, J.L. Cohen, B. Bellier, K. Podsypanina, and D. Klatzmann. 2009a. Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *The Journal of clinical investigation* 119:2648-2662.
- Darrasse-Jeze, G., S. Deroubaix, H. Mouquet, G.D. Victora, T. Eisenreich, K.H. Yao, R.F. Masilamani, M.L. Dustin, A. Rudensky, K. Liu, and M.C. Nussenzweig. 2009b. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 206:1853-1862.
- Davey, G.M., C. Kurts, J.F. Miller, P. Bouillet, A. Strasser, A.G. Brooks, F.R. Carbone, and W.R. Heath. 2002. Peripheral deletion of autoreactive CD8 T cells by cross presentation of self-antigen occurs by a Bcl-2-inhibitable pathway mediated by Bim. *The Journal of experimental medicine* 196:947-955.
- Davidson, T.S., R.J. DiPaolo, J. Andersson, and E.M. Shevach. 2007. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178:4022-4026.
- de Paulis, A., R. Cirillo, A. Ciccarelli, G. de Crescenzo, A. Oriente, and G. Marone. 1991. Characterization of the anti-inflammatory effect of FK-506 on human mast cells. *J Immunol* 147:4278-4285.
- de Vries, I.J., C. Castelli, C. Huygens, J.F. Jacobs, J. Stockis, B. Schuler-Thurner, G.J. Adema, C.J. Punt, L. Rivoltini, G. Schuler, P.G. Coulie, and S. Lucas. 2011. Frequency of circulating Tregs with demethylated FOXP3 intron 1 in melanoma patients receiving tumor vaccines and potentially Treg-depleting agents. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17:841-848.
- Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* 204:1257-1265.
- Debes, G.F., C.N. Arnold, A.J. Young, S. Krautwald, M. Lipp, J.B. Hay, and E.C. Butcher. 2005. Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues. *Nature immunology* 6:889-894.
- Delano, M.J., P.O. Scumpia, J.S. Weinstein, D. Coco, S. Nagaraj, K.M. Kelly-Scumpia, K.A. O'Malley, J.L. Wynn, S. Antonenko, S.Z. Al-Quran, R. Swan, C.S. Chung, M.A. Atkinson, R. Ramphal, D.I. Gabrilovich, W.H. Reeves, A. Ayala, J. Phillips, D. Laface, P.G. Heyworth, M. Clare-Salzler, and L.L. Moldawer. 2007. MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *The Journal of experimental medicine* 204:1463-1474.
- Delgoffe, G.M., T.P. Kole, Y. Zheng, P.E. Zarek, K.L. Matthews, B. Xiao, P.F. Worley, S.C. Kozma, and J.D. Powell. 2009. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* 30:832-844.
- Delovitch, T.L., and B. Singh. 1997. The nonobese diabetic mouse as a model of autoimmune diabetes: immune dysregulation gets the NOD. *Immunity* 7:727-738.
- Derbinski, J., J. Gabler, B. Brors, S. Tierling, S. Jonnakuty, M. Hergenhausen, L. Peltonen, J. Walter, and B. Kyewski. 2005. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *The Journal of experimental medicine* 202:33-45.
- Derbinski, J., A. Schulte, B. Kyewski, and L. Klein. 2001. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nature immunology* 2:1032-1039.

- DeVoss, J., Y. Hou, K. Johannes, W. Lu, G.I. Liou, J. Rinn, H. Chang, R.R. Caspi, L. Fong, and M.S. Anderson. 2006. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *The Journal of experimental medicine* 203:2727-2735.
- Di Giacinto, C., M. Marinaro, M. Sanchez, W. Strober, and M. Boirivant. 2005. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 174:3237-3246.
- Diana, J., V. Brezar, L. Beaudoin, M. Dalod, A. Mellor, A. Tafuri, M. von Herrath, C. Boitard, R. Mallone, and A. Lehuen. 2011. Viral infection prevents diabetes by inducing regulatory T cells through NKT cell-plasmacytoid dendritic cell interplay. *The Journal of experimental medicine* 208:729-745.
- Diana, J., T. Griseri, S. Lagaye, L. Beaudoin, E. Autrusseau, A.S. Gautron, C. Tomkiewicz, A. Herbelin, R. Barouki, M. von Herrath, M. Dalod, and A. Lehuen. 2009. NKT cell-plasmacytoid dendritic cell cooperation via OX40 controls viral infection in a tissue-specific manner. *Immunity* 30:289-299.
- Diana, J., Y. Simoni, L. Furio, L. Beaudoin, B. Agerberth, F. Barrat, and A. Lehuen. 2013. Crosstalk between neutrophils, B-1a cells and plasmacytoid dendritic cells initiates autoimmune diabetes. *Nature medicine* 19:65-73.
- Dinarello, C.A. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87:2095-2147.
- Dinarello, C.A. 2005. The many worlds of reducing interleukin-1. *Arthritis and rheumatism* 52:1960-1967.
- Ding, Y., J. Xu, and J.S. Bromberg. 2012. Regulatory T cell migration during an immune response. *Trends in immunology* 33:174-180.
- Dinh, T.N., T.S. Kyaw, P. Kanellakis, K. To, P. Tipping, B.H. Toh, A. Bobik, and A. Agrotis. 2012. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. *Circulation* 126:1256-1266.
- DiPersio, J.F. 2011. Diabetic stem-cell "mobilopathy". *The New England journal of medicine* 365:2536-2538.
- Doh, J., and M.F. Krummel. 2010. Immunological synapses within context: patterns of cell-cell communication and their application in T-T interactions. *Current topics in microbiology and immunology* 340:25-50.
- Dong, C., A.E. Juedes, U.A. Temann, S. Shresta, J.P. Allison, N.H. Ruddle, and R.A. Flavell. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409:97-101.
- Dong, C., and R.I. Nurieva. 2003. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *Journal of autoimmunity* 21:255-260.
- Dor, Y., J. Brown, O.I. Martinez, and D.A. Melton. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429:41-46.
- Duarte, J.H., S. Zelenay, M.L. Bergman, A.C. Martins, and J. Demengeot. 2009. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *European journal of immunology* 39:948-955.
- Dudda, J.C., and S.F. Martin. 2004. Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments. *Trends in immunology* 25:417-421.
- Ehrenstein, M.R., J.G. Evans, A. Singh, S. Moore, G. Warnes, D.A. Isenberg, and C. Mauri. 2004. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *The Journal of experimental medicine* 200:277-285.
- Elias, D., A. Avron, M. Tamir, and I. Raz. 2006. DiaPep277 preserves endogenous insulin production by immunomodulation in type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1079:340-344.
- Elinav, E., T. Waks, and Z. Eshhar. 2008. Redirection of regulatory T cells with predetermined specificity for the treatment of experimental colitis in mice. *Gastroenterology* 134:2014-2024.

- Elpek, K.G., E.S. Yolcu, D.D. Franke, C. Lacelle, R.H. Schabowsky, and H. Shirwan. 2007. Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J Immunol* 179:7295-7304.
- Emamaullee, J.A., J. Davis, S. Merani, C. Toso, J.F. Elliott, A. Thiesen, and A.M. Shapiro. 2009. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 58:1302-1311.
- Endharti, A.T., I.M. Rifa, Z. Shi, Y. Fukuoka, Y. Nakahara, Y. Kawamoto, K. Takeda, K. Isobe, and H. Suzuki. 2005. Cutting edge: CD8+CD122+ regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-gamma production and proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol* 175:7093-7097.
- Erlich, H., A.M. Valdes, J. Noble, J.A. Carlson, M. Varney, P. Concannon, J.C. Mychaleckyj, J.A. Todd, P. Bonella, A.L. Fear, E. Lavant, A. Louey, and P. Moonsamy. 2008. HLA DR-DQ haplotypes and genotypes and type 1 diabetes risk: analysis of the type 1 diabetes genetics consortium families. *Diabetes* 57:1084-1092.
- Ermann, J., P. Hoffmann, M. Edinger, S. Dutt, F.G. Blankenberg, J.P. Higgins, R.S. Negrin, C.G. Fathman, and S. Strober. 2005. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* 105:2220-2226.
- Evans, J.G., K.A. Chavez-Rueda, A. Eddaoudi, A. Meyer-Bahlburg, D.J. Rawlings, M.R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2007. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* 178:7868-7878.
- Faget, J., N. Bendriss-Vermare, M. Gobert, I. Durand, D. Olive, C. Biota, T. Bachelot, I. Treilleux, S. Goddard-Leon, E. Lavergne, S. Chabaud, J.Y. Blay, C. Caux, and C. Menetrier-Caux. 2012. ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells. *Cancer research* 72:6130-6141.
- Fahlen, L., S. Read, L. Gorelik, S.D. Hurst, R.L. Coffman, R.A. Flavell, and F. Powrie. 2005. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201:737-746.
- Fallarino, F., U. Grohmann, K.W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M.L. Belladonna, M.C. Fioretti, M.L. Alegre, and P. Puccetti. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature immunology* 4:1206-1212.
- Faustman, D., and M. Davis. 2010. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature reviews. Drug discovery* 9:482-493.
- Feuerer, M., J.A. Hill, D. Mathis, and C. Benoist. 2009a. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nature immunology* 10:689-695.
- Feuerer, M., Y. Shen, D.R. Littman, C. Benoist, and D. Mathis. 2009b. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity* 31:654-664.
- Feutren, G., L. Papoz, R. Assan, B. Vialettes, G. Karsenty, P. Vexiau, H. Du Rostu, M. Rodier, J. Sirmay, A. Lallemand, and et al. 1986. Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial. *Lancet* 2:119-124.
- Fife, B.T., and J.A. Bluestone. 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunological reviews* 224:166-182.
- Fife, B.T., K.E. Pauken, T.N. Eagar, T. Obu, J. Wu, Q. Tang, M. Azuma, M.F. Krummel, and J.A. Bluestone. 2009. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nature immunology* 10:1185-1192.
- Finlay, D., and D. Cantrell. 2010. Phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin pathways control T cell migration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1183:149-157.
- Finlay, D.K., E. Rosenzweig, L.V. Sinclair, C. Feijoo-Carnero, J.L. Hukelmann, J. Rolf, A.A. Panteleyev, K. Okkenhaug, and D.A. Cantrell. 2012. PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *The Journal of experimental medicine* 209:2441-2453.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B.L. Salomon. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *The Journal of experimental medicine* 198:737-746.
- Fontenot, J.D., J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005a. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *The Journal of experimental medicine* 202:901-906.
- Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature immunology* 4:330-336.
- Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005b. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature immunology* 6:1142-1151.
- Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005c. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329-341.
- Franceschini, D., M. Paroli, V. Francavilla, M. Videtta, S. Morrone, G. Labbadia, A. Cerino, M.U. Mondelli, and V. Barnaba. 2009. PD-L1 negatively regulates CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs by limiting STAT-5 phosphorylation in patients chronically infected with HCV. *The Journal of clinical investigation* 119:551-564.
- Francisco, L.M., V.H. Salinas, K.E. Brown, V.K. Vanguri, G.J. Freeman, V.K. Kuchroo, and A.H. Sharpe. 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 206:3015-3029.
- Fu, W., G. Wojtkiewicz, R. Weissleder, C. Benoist, and D. Mathis. 2012. Early window of diabetes determinism in NOD mice, dependent on the complement receptor CR1g, identified by noninvasive imaging. *Nature immunology* 13:361-368.
- Furtado, G.C., M.A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze, and J.J. Lafaille. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *The Journal of experimental medicine* 196:851-857.
- Gabrilovich, D. 2004. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews. Immunology* 4:941-952.
- Gabrysova, L., K.S. Nicolson, H.B. Streeter, J. Verhagen, C.A. Sabatos-Peyton, D.J. Morgan, and D.C. Wraith. 2009. Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. *The Journal of experimental medicine* 206:1755-1767.
- Gagliani, N., S. Gregori, T. Jofra, A. Valle, A. Stabilini, D.M. Rothstein, M. Atkinson, M.G. Roncarolo, and M. Battaglia. 2011. Rapamycin combined with anti-CD45RB mAb and IL-10 or with G-CSF induces tolerance in a stringent mouse model of islet transplantation. *PloS one* 6:e28434.
- Gagnerault, M.C., J.J. Luan, C. Lotton, and F. Lepault. 2002. Pancreatic lymph nodes are required for priming of beta cell reactive T cells in NOD mice. *The Journal of experimental medicine* 196:369-377.
- Gallegos, A.M., and M.J. Bevan. 2004. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *The Journal of experimental medicine* 200:1039-1049.
- Gan, M.J., A. Albanese-O'Neill, and M.J. Haller. 2012. Type 1 diabetes: current concepts in epidemiology, pathophysiology, clinical care, and research. *Current problems in pediatric and adolescent health care* 42:269-291.
- Gardner, J.M., J.J. Devoss, R.S. Friedman, D.J. Wong, Y.X. Tan, X. Zhou, K.P. Johannes, M.A. Su, H.Y. Chang, M.F. Krummel, and M.S. Anderson. 2008. Deletional tolerance mediated by extrathymic Aire-expressing cells. *Science* 321:843-847.
- Garg, G., J.R. Tyler, J.H. Yang, A.J. Cutler, K. Downes, M. Pekalski, G.L. Bell, S. Nutland, M. Peakman, J.A. Todd, L.S. Wicker, and T.I. Tree. 2012. Type 1 diabetes-associated IL2RA variation lowers IL-2 signaling and contributes to diminished CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function. *J Immunol* 188:4644-4653.
- Garin, M.I., C.C. Chu, D. Golshayan, E. Cernuda-Morollon, R. Wait, and R.I. Lechler. 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells. *Blood* 109:2058-2065.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gasteiger, G., S. Hemmers, M.A. Firth, A. Le Floch, M. Huse, J.C. Sun, and A.Y. Rudensky. 2013. IL-2-dependent tuning of NK cell sensitivity for target cells is controlled by regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine*
- Gavin, M.A., J.P. Rasmussen, J.D. Fontenot, V. Vasta, V.C. Manganiello, J.A. Beavo, and A.Y. Rudensky. 2007. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 445:771-775.
- Gershon, R.K., and K. Kondo. 1971. Antigenic competition between heterologous erythrocytes. I. Thymic dependency. *J Immunol* 106:1524-1531.
- Geuking, M.B., J. Cahenzli, M.A. Lawson, D.C. Ng, E. Slack, S. Hapfelmeier, K.D. McCoy, and A.J. Macpherson. 2011. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* 34:794-806.
- Ghazarian, L., J. Diana, Y. Simoni, L. Beaudoin, and A. Lehuen. 2013. Prevention or acceleration of type 1 diabetes by viruses. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70:239-255.
- Gobert, M., I. Treilleux, N. Bendriss-Vermare, T. Bachelot, S. Goddard-Leon, V. Arfi, C. Biota, A.C. Doffin, I. Durand, D. Olive, S. Perez, N. Pasqual, C. Faure, I. Ray-Coquard, A. Puisieux, C. Caux, J.Y. Blay, and C. Menetrier-Caux. 2009. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer research* 69:2000-2009.
- Godfrey, D.I., S. Stankovic, and A.G. Baxter. 2010. Raising the NKT cell family. *Nature immunology* 11:197-206.
- Goldstein, J.D., R.S. Balderas, and G. Marodon. 2011. Continuous activation of the CD122/STAT-5 signaling pathway during selection of antigen-specific regulatory T cells in the murine thymus. *PLoS one* 6:e19038.
- Gomez-Cambronero, J. 2003. Rapamycin inhibits GM-CSF-induced neutrophil migration. *FEBS letters* 550:94-100.
- Gondek, D.C., L.F. Lu, S.A. Quezada, S. Sakaguchi, and R.J. Noelle. 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783-1786.
- Gopisetty, A., P. Bhattacharya, C. Haddad, J.C. Bruno, Jr., C. Vasu, L. Miele, and B.S. Prabhakar. 2013. OX40L/Jagged1 Cosignaling by GM-CSF-Induced Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Is Required for the Expansion of Functional Regulatory T Cells. *J Immunol* 190:5516-5525.
- Gordon, J., and L.D. MacLean. 1965. A lymphocyte-stimulating factor produced in vitro. *Nature* 208:795-796.
- Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison. 2010. TCR ligand density and affinity determine peripheral induction of Foxp3 in vivo. *The Journal of experimental medicine* 207:1701-1711.
- Gottschalk, R.A., E. Corse, and J.P. Allison. 2012. Expression of Helios in peripherally induced Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 188:976-980.
- Goubier, A., B. Dubois, H. Gheit, G. Joubert, F. Villard-Truc, C. Asselin-Paturel, G. Trinchieri, and D. Kaiserlian. 2008. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 29:464-475.
- Gourlay, W.A., W.H. Chambers, A.P. Monaco, and T. Maki. 1998. Importance of natural killer cells in the rejection of hamster skin xenografts. *Transplantation* 65:727-734.
- Grainger, J.R., J.A. Hall, N. Bouladoux, G. Oldenhove, and Y. Belkaid. 2010. Microbe-dendritic cell dialog controls regulatory T-cell fate. *Immunological reviews* 234:305-316.
- Gramaglia, I., A.D. Weinberg, M. Lemon, and M. Croft. 1998. Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. *J Immunol* 161:6510-6517.
- Graser, R.T., T.P. DiLorenzo, F. Wang, G.J. Christianson, H.D. Chapman, D.C. Roopenian, S.G. Nathanson, and D.V. Serreze. 2000. Identification of a CD8 T cell that can independently mediate autoimmune diabetes development in the complete absence of CD4 T cell helper functions. *J Immunol* 164:3913-3918.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Gratz, I.K., H.A. Truong, S.H. Yang, M.M. Maurano, K. Lee, A.K. Abbas, and M.D. Rosenblum. 2013. Cutting Edge: Memory Regulatory T Cells Require IL-7 and Not IL-2 for Their Maintenance in Peripheral Tissues. *J Immunol* 190:4483-4487.
- Greeley, S.A., M. Katsumata, L. Yu, G.S. Eisenbarth, D.J. Moore, H. Goodarzi, C.F. Barker, A. Naji, and H. Noorchashm. 2002. Elimination of maternally transmitted autoantibodies prevents diabetes in nonobese diabetic mice. *Nature medicine* 8:399-402.
- Green, E.A., L. Gorelik, C.M. McGregor, E.H. Tran, and R.A. Flavell. 2003. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:10878-10883.
- Gregori, S., N. Giaratana, S. Smioldo, and L. Adorini. 2003. Dynamics of pathogenic and suppressor T cells in autoimmune diabetes development. *J Immunol* 171:4040-4047.
- Griseri, T., M. Asquith, C. Thompson, and F. Powrie. 2010. OX40 is required for regulatory T cell-mediated control of colitis. *The Journal of experimental medicine* 207:699-709.
- Grohmann, U., F. Fallarino, R. Bianchi, C. Orabona, C. Vacca, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2003. A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. *The Journal of experimental medicine* 198:153-160.
- Grossman, W.J., J.W. Verbsky, B.L. Tollefsen, C. Kemper, J.P. Atkinson, and T.J. Ley. 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 104:2840-2848.
- Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
- Guo, F., C. Iclozan, W.K. Suh, C. Anasetti, and X.Z. Yu. 2008. CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. *J Immunol* 181:2285-2291.
- Gur, C., A. Porgador, M. Elboim, R. Gazit, S. Mizrahi, N. Stern-Ginossar, H. Achdout, H. Ghadially, Y. Dor, T. Nir, V. Doviner, O. HersHKovitz, M. Mendelson, Y. Naparstek, and O. Mandelboim. 2010. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nature immunology* 11:121-128.
- Hadeiba, H., T. Sato, A. Habtezion, C. Oderup, J. Pan, and E.C. Butcher. 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nature immunology* 9:1253-1260.
- Hamano, R., J. Huang, T. Yoshimura, J.J. Oppenheim, and X. Chen. 2011. TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *European journal of immunology* 41:2010-2020.
- Hamilton, S.E., J.M. Schenkel, A.D. Akue, and S.C. Jameson. 2010. IL-2 complex treatment can protect naive mice from bacterial and viral infection. *J Immunol* 185:6584-6590.
- Harada, Y., C. Elly, G. Ying, J.H. Paik, R.A. DePinho, and Y.C. Liu. 2010. Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 207:1381-1391.
- Harbers, S.O., A. Crocker, G. Catalano, V. D'Agati, S. Jung, D.D. Desai, and R. Clynes. 2007. Antibody-enhanced cross-presentation of self antigen breaks T cell tolerance. *The Journal of clinical investigation* 117:1361-1369.
- Harnaha, J., J. Machen, M. Wright, R. Lakomy, A. Styche, M. Trucco, S. Makaroun, and N. Giannoukakis. 2006. Interleukin-7 is a survival factor for CD4+ CD25+ T-cells and is expressed by diabetes-suppressive dendritic cells. *Diabetes* 55:158-170.
- Hawiger, D., E. Tran, W. Du, C.J. Booth, L. Wen, C. Dong, and R.A. Flavell. 2008. ICOS mediates the development of insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 180:3140-3147.
- Haxhinasto, S., D. Mathis, and C. Benoist. 2008. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *The Journal of experimental medicine* 205:565-574.

- Hegde, S., L. Fox, X. Wang, and J.E. Gumperz. 2010. Autoreactive natural killer T cells: promoting immune protection and immune tolerance through varied interactions with myeloid antigen-presenting cells. *Immunology* 130:471-483.
- Heinig, M., E. Petretto, C. Wallace, L. Bottolo, M. Rotival, H. Lu, Y. Li, R. Sarwar, S.R. Langley, A. Bauerfeind, O. Hummel, Y.A. Lee, S. Paskas, C. Rintisch, K. Saar, J. Cooper, R. Buchan, E.E. Gray, J.G. Cyster, J. Erdmann, C. Hengstenberg, S. Maouche, W.H. Ouwehand, C.M. Rice, N.J. Samani, H. Schunkert, A.H. Goodall, H. Schulz, H.G. Roeder, M. Vingron, S. Blankenberg, T. Munzel, T. Zeller, S. Szymczak, A. Ziegler, L. Tiret, D.J. Smyth, M. Pravenec, T.J. Aitman, F. Cambien, D. Clayton, J.A. Todd, N. Hubner, and S.A. Cook. 2010. A trans-acting locus regulates an anti-viral expression network and type 1 diabetes risk. *Nature* 467:460-464.
- Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253:905-909.
- Heninger, A.K., A. Theil, C. Wilhelm, C. Petzold, N. Huebel, K. Kretschmer, E. Bonifacio, and P. Monti. 2012. IL-7 abrogates suppressive activity of human CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and allows expansion of alloreactive and autoreactive T cells. *J Immunol* 189:5649-5658.
- Herman, A.E., G.J. Freeman, D. Mathis, and C. Benoist. 2004. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *The Journal of experimental medicine* 199:1479-1489.
- Herold, K.C., S.E. Gitelman, U. Masharani, W. Hagopian, B. Bisikirska, D. Donaldson, K. Rother, B. Diamond, D.M. Harlan, and J.A. Bluestone. 2005. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 54:1763-1769.
- Herold, K.C., W. Hagopian, J.A. Auger, E. Poumian-Ruiz, L. Taylor, D. Donaldson, S.E. Gitelman, D.M. Harlan, D. Xu, R.A. Zivin, and J.A. Bluestone. 2002. Anti-CD3 monoclonal antibody in new-onset type 1 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 346:1692-1698.
- Herold, K.C., M.D. Pescovitz, P. McGee, H. Krause-Steinrauf, L.M. Spain, K. Bourcier, A. Asare, Z. Liu, J.M. Lachin, and H.M. Dosch. 2011. Increased T cell proliferative responses to islet antigens identify clinical responders to anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) therapy in type 1 diabetes. *J Immunol* 187:1998-2005.
- Hill, J.A., M. Feuerer, K. Tash, S. Haxhinasto, J. Perez, R. Melamed, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 27:786-800.
- Hilliard, B., A. Wilmen, C. Seidel, T.S. Liu, R. Goke, and Y. Chen. 2001. Roles of TNF-related apoptosis-inducing ligand in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 166:1314-1319.
- Hinterberger, M., M. Aichinger, O. Prazeres da Costa, D. Voehringer, R. Hoffmann, and L. Klein. 2010. Autonomous role of medullary thymic epithelial cells in central CD4(+) T cell tolerance. *Nature immunology* 11:512-519.
- Hogquist, K.A., T.A. Baldwin, and S.C. Jameson. 2005. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nature reviews. Immunology* 5:772-782.
- Honeyman, M.C., B.S. Coulson, N.L. Stone, S.A. Gellert, P.N. Goldwater, C.E. Steele, J.J. Couper, B.D. Tait, P.G. Colman, and L.C. Harrison. 2000. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. *Diabetes* 49:1319-1324.
- Honkanen, J., J.K. Nieminen, R. Gao, K. Luopajarvi, H.M. Salo, J. Ilonen, M. Knip, T. Otonkoski, and O. Vaarala. 2010. IL-17 immunity in human type 1 diabetes. *J Immunol* 185:1959-1967.
- Horai, R., S. Saijo, H. Tanioka, S. Nakae, K. Sudo, A. Okahara, T. Ikuse, M. Asano, and Y. Iwakura. 2000. Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 191:313-320.

- Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
- Horvath, L., L. Cervenak, M. Oroszlan, Z. Prohaszka, K. Uray, F. Hudecz, E. Baranyi, L. Madacsy, M. Singh, L. Romics, G. Fust, and P. Panczel. 2002. Antibodies against different epitopes of heat-shock protein 60 in children with type 1 diabetes mellitus. *Immunology letters* 80:155-162.
- Hou, Y., J. DeVoss, V. Dao, S. Kwek, J.P. Simko, D.G. McNeel, M.S. Anderson, and L. Fong. 2009. An aberrant prostate antigen-specific immune response causes prostatitis in mice and is associated with chronic prostatitis in humans. *The Journal of clinical investigation* 119:2031-2041.
- Housley, W.J., C.O. Adams, F.C. Nichols, L. Puddington, E.G. Lingenheld, L. Zhu, T.V. Rajan, and R.B. Clark. 2011. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function. *J Immunol* 186:6779-6787.
- Hsieh, C.S., H.M. Lee, and C.W. Lio. 2012. Selection of regulatory T cells in the thymus. *Nature reviews. Immunology* 12:157-167.
- Hsieh, C.S., Y. Liang, A.J. Tyznik, S.G. Self, D. Liggitt, and A.Y. Rudensky. 2004. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors. *Immunity* 21:267-277.
- Hsieh, C.S., Y. Zheng, Y. Liang, J.D. Fontenot, and A.Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nature immunology* 7:401-410.
- Hu, C.Y., D. Rodriguez-Pinto, W. Du, A. Ahuja, O. Henegariu, F.S. Wong, M.J. Shlomchik, and L. Wen. 2007. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *The Journal of clinical investigation* 117:3857-3867.
- Huang, B., J. Zhao, Z. Lei, S. Shen, D. Li, G.X. Shen, G.M. Zhang, and Z.H. Feng. 2009. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO reports* 10:180-185.
- Huang, C.T., C.J. Workman, D. Flies, X. Pan, A.L. Marson, G. Zhou, E.L. Hipkiss, S. Ravi, J. Kowalski, H.I. Levitsky, J.D. Powell, D.M. Pardoll, C.G. Drake, and D.A. Vignali. 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 21:503-513.
- Huehn, J., K. Siegmund, J.C. Lehmann, C. Siewert, U. Haubold, M. Feuerer, G.F. Debes, J. Lauber, O. Frey, G.K. Przybylski, U. Niesner, M. de la Rosa, C.A. Schmidt, R. Brauer, J. Buer, A. Scheffold, and A. Hamann. 2004. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 199:303-313.
- Hulme, M.A., C.H. Wasserfall, M.A. Atkinson, and T.M. Brusko. 2012. Central role for interleukin-2 in type 1 diabetes. *Diabetes* 61:14-22.
- Hunter, K., D. Rainbow, V. Plagnol, J.A. Todd, L.B. Peterson, and L.S. Wicker. 2007. Interactions between Idd5.1/Ctla4 and other type 1 diabetes genes. *J Immunol* 179:8341-8349.
- Hutchings, P., H. Rosen, L. O'Reilly, E. Simpson, S. Gordon, and A. Cooke. 1990. Transfer of diabetes in mice prevented by blockade of adhesion-promoting receptor on macrophages. *Nature* 348:639-642.
- Hutloff, A., A.M. Dittrich, K.C. Beier, B. Eljaschewitsch, R. Kraft, I. Anagnostopoulos, and R.A. Kroczeck. 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397:263-266.
- Huurman, V.A., P.E. van der Meide, G. Duinkerken, S. Willemen, I.R. Cohen, D. Elias, and B.O. Roep. 2008. Immunological efficacy of heat shock protein 60 peptide DiaPep277 therapy in clinical type I diabetes. *Clinical and experimental immunology* 152:488-497.
- Ilan, Y., E. Zigmond, G. Lalazar, A. Dembinsky, A. Ben Ya'acov, N. Hemed, I. Kasis, E. Axelrod, L. Zolotarov, A. Klein, M. El Haj, R. Gandhi, C. Baecher-Allan, H. Wu, G. Murugaiyan, P. Kivisakk, M.F. Farez, F.J. Quintana, S.J. Khoury, and H.L. Weiner. 2010. Oral administration of OKT3 monoclonal antibody to human subjects induces a dose-dependent immunologic effect in T cells and dendritic cells. *Journal of clinical immunology* 30:167-177.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Irie, J., Y. Wu, K. Kachapati, R.S. Mittler, and W.M. Ridgway. 2007. Modulating protective and pathogenic CD4⁺ subsets via CD137 in type 1 diabetes. *Diabetes* 56:186-196.
- Irla, M., N. Kupfer, T. Suter, R. Lissilaa, M. Benkhoucha, J. Skupsky, P.H. Lalive, A. Fontana, W. Reith, and S. Hugues. 2010. MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 207:1891-1905.
- Ishida, Y., Y. Agata, K. Shibahara, and T. Honjo. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO journal* 11:3887-3895.
- Ito, T., R. Amakawa, M. Inaba, T. Hori, M. Ota, K. Nakamura, M. Takebayashi, M. Miyaji, T. Yoshimura, K. Inaba, and S. Fukuhara. 2004. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol* 172:4253-4259.
- Ito, T., S. Hanabuchi, Y.H. Wang, W.R. Park, K. Arima, L. Bover, F.X. Qin, M. Gilliet, and Y.J. Liu. 2008. Two functional subsets of FOXP3⁺ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* 28:870-880.
- Ito, T., Y.H. Wang, O. Duramad, S. Hanabuchi, O.A. Perng, M. Gilliet, F.X. Qin, and Y.J. Liu. 2006. OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:13138-13143.
- Itoh, M., T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, and S. Sakaguchi. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* 162:5317-5326.
- Ivanov, II, K. Atarashi, N. Manel, E.L. Brodie, T. Shima, U. Karaoz, D. Wei, K.C. Goldfarb, C.A. Santee, S.V. Lynch, T. Tanoue, A. Imaoka, K. Itoh, K. Takeda, Y. Umesaki, K. Honda, and D.R. Littman. 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* 139:485-498.
- Izcue, A., S. Hue, S. Buonocore, C.V. Arancibia-Carcamo, P.P. Ahern, Y. Iwakura, K.J. Maloy, and F. Powrie. 2008. Interleukin-23 restrains regulatory T cell activity to drive T cell-dependent colitis. *Immunity* 28:559-570.
- Jacob, C.O., S. Aiso, S.A. Michie, H.O. McDevitt, and H. Acha-Orbea. 1990. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by tumor necrosis factor (TNF): similarities between TNF-alpha and interleukin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:968-972.
- Jacob, C.O., and H.O. McDevitt. 1988. Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune 'lupus' nephritis. *Nature* 331:356-358.
- Janke, M., E.J. Witsch, H.W. Mages, A. Hutloff, and R.A. Kroczeck. 2006. Eminent role of ICOS costimulation for T cells interacting with plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* 118:353-360.
- Jansen, A., F. Homo-Delarche, H. Hooijkaas, P.J. Leenen, M. Dardenne, and H.A. Drexhage. 1994. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 43:667-675.
- Jenkins, M.K., and R.H. Schwartz. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *The Journal of experimental medicine* 165:302-319.
- Jenner, M., G. Bradish, C. Stiller, and P. Atkison. 1992. Cyclosporin A treatment of young children with newly-diagnosed type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. London Diabetes Study Group. *Diabetologia* 35:884-888.
- Jiang, H., S.M. Canfield, M.P. Gallagher, H.H. Jiang, Y. Jiang, Z. Zheng, and L. Chess. 2010. HLA-E-restricted regulatory CD8(+) T cells are involved in development and control of human autoimmune type 1 diabetes. *The Journal of clinical investigation* 120:3641-3650.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Johnston, O., C.L. Rose, A.C. Webster, and J.S. Gill. 2008. Sirolimus is associated with new-onset diabetes in kidney transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 19:1411-1418.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A.H. Enk. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *The Journal of experimental medicine* 193:1285-1294.
- Jordan, M.S., A. Boesteanu, A.J. Reed, A.L. Petrone, A.E. Holenbeck, M.A. Lerman, A. Naji, and A.J. Caton. 2001. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nature immunology* 2:301-306.
- Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky. 2012. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual review of immunology* 30:531-564.
- Jun, H.S., C.S. Yoon, L. Zbytnuik, N. van Rooijen, and J.W. Yoon. 1999. The role of macrophages in T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *The Journal of experimental medicine* 189:347-358.
- Kadri, N., M. Blomqvist, and S.L. Cardell. 2008. Type II natural killer T cells: a new target for immunomodulation? *Expert review of clinical immunology* 4:615-627.
- Kadri, N., E. Korpos, S. Gupta, C. Briet, L. Lofbom, H. Yagita, A. Lehuen, C. Boitard, D. Holmberg, L. Sorokin, and S.L. Cardell. 2012. CD4(+) type II NKT cells mediate ICOS and programmed death-1-dependent regulation of type 1 diabetes. *J Immunol* 188:3138-3149.
- Kanagawa, O., A. Militech, and B.A. Vaupe. 2002. Regulation of diabetes development by regulatory T cells in pancreatic islet antigen-specific TCR transgenic nonobese diabetic mice. *J Immunol* 168:6159-6164.
- Kared, H., A. Masson, H. Adle-Biasette, J.F. Bach, L. Chatenoud, and F. Zavala. 2005. Treatment with granulocyte colony-stimulating factor prevents diabetes in NOD mice by recruiting plasmacytoid dendritic cells and functional CD4(+)CD25(+) regulatory T-cells. *Diabetes* 54:78-84.
- Karjalainen, J., J.M. Martin, M. Knip, J. Ilonen, B.H. Robinson, E. Savilahti, H.K. Akerblom, and H.M. Dosch. 1992. A bovine albumin peptide as a possible trigger of insulin-dependent diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 327:302-307.
- Katz, J.D., B. Wang, K. Haskins, C. Benoist, and D. Mathis. 1993. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell* 74:1089-1100.
- Kaufman, D.L., M. Clare-Salzler, J. Tian, T. Forsthuber, G.S. Ting, P. Robinson, M.A. Atkinson, E.E. Sercarz, A.J. Tobin, and P.V. Lehmann. 1993. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366:69-72.
- Keller, R.J. 1990. Cellular immunity to human insulin in individuals at high risk for the development of type I diabetes mellitus. *Journal of autoimmunity* 3:321-327.
- Kerdiles, Y.M., E.L. Stone, D.R. Beisner, M.A. McGargill, I.L. Ch'en, C. Stockmann, C.D. Katayama, and S.M. Hedrick. 2010. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity* 33:890-904.
- Keymeulen, B., S. Candon, S. Fafi-Kremer, A. Ziegler, M. Leruez-Ville, C. Mathieu, E. Vandemeulebroucke, M. Walter, L. Crenier, E. Thervet, C. Legendre, D. Pierard, G. Hale, H. Waldmann, J.F. Bach, J.M. Seigneurin, D. Pipeleers, and L. Chatenoud. 2010. Transient Epstein-Barr virus reactivation in CD3 monoclonal antibody-treated patients. *Blood* 115:1145-1155.
- Keymeulen, B., E. Vandemeulebroucke, A.G. Ziegler, C. Mathieu, L. Kaufman, G. Hale, F. Gorus, M. Goldman, M. Walter, S. Candon, L. Schandene, L. Crenier, C. De Block, J.M. Seigneurin, P. De Pauw, D. Pierard, I. Weets, P. Rebello, P. Bird, E. Berrie, M. Frewin, H. Waldmann, J.F. Bach, D. Pipeleers, and L. Chatenoud. 2005. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *The New England journal of medicine* 352:2598-2608.
- Kim, G.Y., D.L. Ligons, C. Hong, M.A. Luckey, H.R. Keller, X. Tai, P.J. Lucas, R.E. Gress, and J.H. Park. 2012. An in vivo IL-7 requirement for peripheral Foxp3+ regulatory T cell homeostasis. *J Immunol* 188:5859-5866.

- King, I.L., T.L. Dickendesh, and B.M. Segal. 2009. Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 113:3190-3197.
- Kinter, A.L., E.J. Godbout, J.P. McNally, I. Sereti, G.A. Roby, M.A. O'Shea, and A.S. Fauci. 2008. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol* 181:6738-6746.
- Kitani, A., K. Chua, K. Nakamura, and W. Strober. 2000. Activated self-MHC-reactive T cells have the cytokine phenotype of Th3/T regulatory cell 1 T cells. *J Immunol* 165:691-702.
- Klapper, J.A., S.G. Downey, F.O. Smith, J.C. Yang, M.S. Hughes, U.S. Kammula, R.M. Sherry, R.E. Royal, S.M. Steinberg, and S. Rosenberg. 2008. High-dose interleukin-2 for the treatment of metastatic renal cell carcinoma : a retrospective analysis of response and survival in patients treated in the surgery branch at the National Cancer Institute between 1986 and 2006. *Cancer* 113:293-301.
- Klein, L., M. Hinterberger, G. Wirnsberger, and B. Kyewski. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nature reviews. Immunology* 9:833-844.
- Klein, L., and K. Jovanovic. 2011. Regulatory T cell lineage commitment in the thymus. *Seminars in immunology* 23:401-409.
- Koch, M.A., G. Tucker-Heard, N.R. Perdue, J.R. Killebrew, K.B. Urdahl, and D.J. Campbell. 2009. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nature immunology* 10:595-602.
- Komatsu, N., M.E. Mariotti-Ferrandiz, Y. Wang, B. Malissen, H. Waldmann, and S. Hori. 2009. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:1903-1908.
- Koonpaew, S., S. Shen, L. Flowers, and W. Zhang. 2006. LAT-mediated signaling in CD4+CD25+ regulatory T cell development. *The Journal of experimental medicine* 203:119-129.
- Koreth, J., K. Matsuoka, H.T. Kim, S.M. McDonough, B. Bindra, E.P. Alyea, 3rd, P. Armand, C. Cutler, V.T. Ho, N.S. Treister, D.C. Bienfang, S. Prasad, D. Tzachanis, R.M. Joyce, D.E. Avigan, J.H. Antin, J. Ritz, and R.J. Soiffer. 2011. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *The New England journal of medicine* 365:2055-2066.
- Korn, T., J. Reddy, W. Gao, E. Bettelli, A. Awasthi, T.R. Petersen, B.T. Backstrom, R.A. Sobel, K.W. Wucherpfennig, T.B. Strom, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2007. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nature medicine* 13:423-431.
- Kornete, M., and C.A. Piccirillo. 2011. Critical co-stimulatory pathways in the stability of Foxp3+ Treg cell homeostasis in Type I diabetes. *Autoimmunity reviews* 11:104-111.
- Kornete, M., E. Sgouroudis, and C.A. Piccirillo. 2012. ICOS-dependent homeostasis and function of Foxp3+ regulatory T cells in islets of nonobese diabetic mice. *J Immunol* 188:1064-1074.
- Koulmanda, M., E. Budo, S. Bonner-Weir, A. Qipo, P. Putheti, N. Degauque, H. Shi, Z. Fan, J.S. Flier, H. Auchincloss, Jr., X.X. Zheng, and T.B. Strom. 2007. Modification of adverse inflammation is required to cure new-onset type 1 diabetic hosts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:13074-13079.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M.C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature immunology* 6:1219-1227.
- Krieg, C., S. Letourneau, G. Pantaleo, and O. Boyman. 2010. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:11906-11911.
- Kriegel, M.A., E. Sefik, J.A. Hill, H.J. Wu, C. Benoist, and D. Mathis. 2011. Naturally transmitted segmented filamentous bacteria segregate with diabetes protection in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108:11548-11553.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Kubach, J., P. Lutter, T. Bopp, S. Stoll, C. Becker, E. Huter, C. Richter, P. Weingarten, T. Warger, J. Knop, S. Mullner, J. Wijdenes, H. Schild, E. Schmitt, and H. Jonuleit. 2007. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their anergy and suppressive function. *Blood* 110:1550-1558.
- Kuhn, R., J. Lohler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Muller. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75:263-274.
- Kurts, C., R.M. Sutherland, G. Davey, M. Li, A.M. Lew, E. Blanas, F.R. Carbone, J.F. Miller, and W.R. Heath. 1999. CD8 T cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:12703-12707.
- Lal, G., and J.S. Bromberg. 2009. Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 114:3727-3735.
- Laloux, V., L. Beaudoin, D. Jeske, C. Carnaud, and A. Lehuen. 2001. NK T cell-induced protection against diabetes in V alpha 14-J alpha 281 transgenic nonobese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen. *J Immunol* 166:3749-3756.
- Lamhamedi-Cherradi, S.E., S. Zheng, R.M. Tisch, and Y.H. Chen. 2003a. Critical roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in type 1 diabetes. *Diabetes* 52:2274-2278.
- Lamhamedi-Cherradi, S.E., S.J. Zheng, K.A. Maguschak, J. Peschon, and Y.H. Chen. 2003b. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL-/- mice. *Nature immunology* 4:255-260.
- Lamming, D.W., L. Ye, P. Katajisto, M.D. Goncalves, M. Saitoh, D.M. Stevens, J.G. Davis, A.B. Salmon, A. Richardson, R.S. Ahima, D.A. Guertin, D.M. Sabatini, and J.A. Baur. 2012. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 335:1638-1643.
- Lawson, J.M., J. Tremble, C. Dayan, H. Beyan, R.D. Leslie, M. Peakman, and T.I. Tree. 2008. Increased resistance to CD4+CD25hi regulatory T cell-mediated suppression in patients with type 1 diabetes. *Clinical and experimental immunology* 154:353-359.
- Lazar, L., R. Ofan, N. Weintrob, A. Avron, M. Tamir, D. Elias, M. Phillip, and Z. Josefsberg. 2007. Heat-shock protein peptide DiaPep277 treatment in children with newly diagnosed type 1 diabetes: a randomised, double-blind phase II study. *Diabetes/metabolism research and reviews* 23:286-291.
- Lee, I.F., X. Wang, J. Hao, N. Akhoundsadeh, L. Chen, L. Liu, S. Langermann, D. Ou, and G.L. Warnock. 2013. B7-H4.Ig inhibits the development of Type 1 diabetes by regulating Th17 cells in NOD mice. *Cellular immunology* 282:1-8.
- Lee, J.H., S.G. Kang, and C.H. Kim. 2007. FoxP3+ T cells undergo conventional first switch to lymphoid tissue homing receptors in thymus but accelerated second switch to nonlymphoid tissue homing receptors in secondary lymphoid tissues. *J Immunol* 178:301-311.
- Lee, L.F., B. Xu, S.A. Michie, G.F. Beilhack, T. Warganich, S. Turley, and H.O. McDevitt. 2005. The role of TNF-alpha in the pathogenesis of type 1 diabetes in the nonobese diabetic mouse: analysis of dendritic cell maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:15995-16000.
- Lee, P.T., A. Putnam, K. Benlagha, L. Teyton, P.A. Gottlieb, and A. Bendelac. 2002. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *The Journal of clinical investigation* 110:793-800.
- Lee, Y.H., Y. Ishida, M. Rifa'i, Z. Shi, K. Isobe, and H. Suzuki. 2008. Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180:825-832.
- Lehuen, A., J. Diana, P. Zacccone, and A. Cooke. 2010. Immune cell crosstalk in type 1 diabetes. *Nature reviews. Immunology* 10:501-513.
- Leibowitz, U., A. Antonovsky, J.M. Medalie, H.A. Smith, L. Halpern, and M. Alter. 1966. Epidemiological study of multiple sclerosis in Israel. II. Multiple sclerosis and level of sanitation. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 29:60-68.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lennon, G.P., M. Bettini, A.R. Burton, E. Vincent, P.Y. Arnold, P. Santamaria, and D.A. Vignali. 2009. T cell islet accumulation in type 1 diabetes is a tightly regulated, cell-autonomous event. *Immunity* 31:643-653.
- Letourneau, S., E.M. van Leeuwen, C. Krieg, C. Martin, G. Pantaleo, J. Sprent, C.D. Surh, and O. Boyman. 2010. IL-2/anti-IL-2 antibody complexes show strong biological activity by avoiding interaction with IL-2 receptor alpha subunit CD25. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:2171-2176.
- Leung, M.W., S. Shen, and J.J. Lafaille. 2009. TCR-dependent differentiation of thymic Foxp3⁺ cells is limited to small clonal sizes. *The Journal of experimental medicine* 206:2121-2130.
- Lewis, E.C., M. Mizrahi, M. Toledano, N. Defelice, J.L. Wright, A. Churg, L. Shapiro, and C.A. Dinarello. 2008. alpha1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:16236-16241.
- Li, M.O., S. Sanjabi, and R.A. Flavell. 2006. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 25:455-471.
- Li, Q., B. Xu, S.A. Michie, K.H. Rubins, R.D. Schreiber, and H.O. McDevitt. 2008. Interferon-alpha initiates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:12439-12444.
- Lin, C.H., and T. Hunig. 2003. Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist. *European journal of immunology* 33:626-638.
- Lin, X., E.E. Hamilton-Williams, D.B. Rainbow, K.M. Hunter, Y.D. Dai, J. Cheung, L.B. Peterson, L.S. Wicker, and L.A. Sherman. 2013. Genetic Interactions among Idd3, Idd5.1, Idd5.2, and Idd5.3 Protective Loci in the Nonobese Diabetic Mouse Model of Type 1 Diabetes. *J Immunol* 190:3109-3120.
- Linterman, M.A., W. Pierson, S.K. Lee, A. Kallies, S. Kawamoto, T.F. Rayner, M. Srivastava, D.P. Divekar, L. Beaton, J.J. Hogan, S. Fagarasan, A. Liston, K.G. Smith, and C.G. Vinuesa. 2011. Foxp3⁺ follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature medicine* 17:975-982.
- Lio, C.W., and C.S. Hsieh. 2008. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* 28:100-111.
- Liston, A., D.H. Gray, S. Lesage, A.L. Fletcher, J. Wilson, K.E. Webster, H.S. Scott, R.L. Boyd, L. Peltonen, and C.C. Goodnow. 2004. Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 200:1015-1026.
- Liston, A., L.F. Lu, D. O'Carroll, A. Tarakhovsky, and A.Y. Rudensky. 2008a. Dicer-dependent microRNA pathway safeguards regulatory T cell function. *The Journal of experimental medicine* 205:1993-2004.
- Liston, A., K.M. Nutsch, A.G. Farr, J.M. Lund, J.P. Rasmussen, P.A. Koni, and A.Y. Rudensky. 2008b. Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:11903-11908.
- Liu, K., G.D. Vitoria, T.A. Schwickert, P. Guernonprez, M.M. Meredith, K. Yao, F.F. Chu, G.J. Randolph, A.Y. Rudensky, and M. Nussenzweig. 2009. In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 324:392-397.
- Liu, W., A.L. Putnam, Z. Xu-Yu, G.L. Szot, M.R. Lee, S. Zhu, P.A. Gottlieb, P. Kapranov, T.R. Gingeras, B. Fazekas de St Groth, C. Clayberger, D.M. Soper, S.F. Ziegler, and J.A. Bluestone. 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 203:1701-1711.
- Liu, Y., P. Zhang, J. Li, A.B. Kulkarni, S. Perruche, and W. Chen. 2008. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature immunology* 9:632-640.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Lohning, M., A. Hutloff, T. Kallinich, H.W. Mages, K. Bonhagen, A. Radbruch, E. Hamelmann, and R.A. Kroczeck. 2003. Expression of ICOS in vivo defines CD4⁺ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10. *The Journal of experimental medicine* 197:181-193.
- Lohr, J., B. Knoechel, E.C. Kahn, and A.K. Abbas. 2004. Role of B7 in T cell tolerance. *J Immunol* 173:5028-5035.
- Long, M., S.G. Park, I. Strickland, M.S. Hayden, and S. Ghosh. 2009. Nuclear factor-kappaB modulates regulatory T cell development by directly regulating expression of Foxp3 transcription factor. *Immunity* 31:921-931.
- Long, S.A., M. Rieck, S. Sanda, J.B. Bollyky, P.L. Samuels, R. Goland, A. Ahmann, A. Rabinovitch, S. Aggarwal, D. Phippard, L.A. Turka, M.R. Ehlers, P.J. Bianchine, K.D. Boyle, S.A. Adah, J.A. Bluestone, J.H. Buckner, and C.J. Greenbaum. 2012. Rapamycin/IL-2 combination therapy in patients with type 1 diabetes augments Tregs yet transiently impairs beta-cell function. *Diabetes* 61:2340-2348.
- Lu, L., H.J. Kim, M.B. Werneck, and H. Cantor. 2008. Regulation of CD8⁺ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:19420-19425.
- Lu, L.F., M.P. Boldin, A. Chaudhry, L.L. Lin, K.D. Taganov, T. Hanada, A. Yoshimura, D. Baltimore, and A.Y. Rudensky. 2010. Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses. *Cell* 142:914-929.
- Lu, L.F., T.H. Thai, D.P. Calado, A. Chaudhry, M. Kubo, K. Tanaka, G.B. Loeb, H. Lee, A. Yoshimura, K. Rajewsky, and A.Y. Rudensky. 2009. Foxp3-dependent microRNA155 confers competitive fitness to regulatory T cells by targeting SOCS1 protein. *Immunity* 30:80-91.
- Ludewig, B., B. Odermatt, S. Landmann, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel. 1998. Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue. *The Journal of experimental medicine* 188:1493-1501.
- Ludvigsson, J., D. Krisky, R. Casas, T. Battelino, L. Castano, J. Greening, O. Kordonouri, T. Otonkoski, P. Pozzilli, J.J. Robert, H.J. Veeze, J. Palmer, U. Samuelsson, H. Elding Larsson, J. Aman, G. Kardell, J. Neiderud Helsingborg, G. Lundstrom, E. Albinsson, A. Carlsson, M. Nordvall, H. Fors, C.G. Arvidsson, S. Edvardson, R. Hanas, K. Larsson, B. Rathsmann, H. Forsgren, H. Desaix, G. Forsander, N.O. Nilsson, C.G. Akesson, P. Keskinen, R. Veijola, T. Talvitie, K. Raile, T. Kapellen, W. Burger, A. Neu, I. Engelsberger, B. Heidtmann, S. Bechtold, D. Leslie, F. Chiarelli, A. Cicognani, G. Chiumello, F. Cerutti, G.V. Zuccotti, A. Gomez Gila, I. Rica, R. Barrio, M. Clemente, M.J. Lopez Garcia, M. Rodriguez, I. Gonzalez, J.P. Lopez, M. Oyarzabal, H.M. Reeser, R. Nuboer, P. Stouthart, N. Bratina, N. Bratanic, M. de Kerdanet, J. Weill, N. Ser, P. Barat, A.M. Bertrand, J.C. Carel, R. Reynaud, R. Coutant, and S. Baron. 2012. GAD65 antigen therapy in recently diagnosed type 1 diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* 366:433-442.
- Machen, J., J. Harnaha, R. Lakomy, A. Styche, M. Trucco, and N. Giannoukakis. 2004. Antisense oligonucleotides down-regulating costimulation confer diabetes-preventive properties to nonobese diabetic mouse dendritic cells. *J Immunol* 173:4331-4341.
- Maerten, P., B.S. Kwon, C. Shen, G. De Hertogh, P. Cadot, D.M. Bullens, L. Overbergh, C. Mathieu, G. Van Assche, K. Geboes, P. Rutgeerts, and J.L. Ceuppens. 2006. Involvement of 4-1BB (CD137)-4-1BBLigand interaction in the modulation of CD4 T cell-mediated inflammatory colitis. *Clinical and experimental immunology* 143:228-236.
- Mahesh, S.P., Z. Li, B. Liu, R.N. Fariss, and R.B. Nussenblatt. 2006. Expression of GITR ligand abrogates immunosuppressive function of ocular tissue and differentially modulates inflammatory cytokines and chemokines. *European journal of immunology* 36:2128-2138.
- Makino, Y., R. Kanno, T. Ito, K. Higashino, and M. Taniguchi. 1995. Predominant expression of invariant V alpha 14⁺ TCR alpha chain in NK1.1⁺ T cell populations. *International immunology* 7:1157-1161.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Malek, T.R., and I. Castro. 2010. Interleukin-2 receptor signaling: at the interface between tolerance and immunity. *Immunity* 33:153-165.
- Malmstrom, V., D. Shipton, B. Singh, A. Al-Shamkhani, M.J. Puklavec, A.N. Barclay, and F. Powrie. 2001. CD134L expression on dendritic cells in the mesenteric lymph nodes drives colitis in T cell-restored SCID mice. *J Immunol* 166:6972-6981.
- Maloy, K.J., and F. Powrie. 2001. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature immunology* 2:816-822.
- Mandrup-Poulsen, T. 1996. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 39:1005-1029.
- Mantel, P.Y., N. Ouaked, B. Ruckert, C. Karagiannidis, R. Welz, K. Blaser, and C.B. Schmidt-Weber. 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176:3593-3602.
- Margolin, K., M.B. Atkins, J.P. Dutcher, M.S. Ernstoff, J.W. Smith, 2nd, J.I. Clark, J. Baar, J. Sosman, J. Weber, C. Lathia, J. Brunetti, F. Cihon, and B. Schwartz. 2007. Phase I trial of BAY 50-4798, an interleukin-2-specific agonist in advanced melanoma and renal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 13:3312-3319.
- Marie, J.C., J.J. Letterio, M. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 201:1061-1067.
- Marie, J.C., D. Liggitt, and A.Y. Rudensky. 2006. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25:441-454.
- Markle, J.G., D.N. Frank, S. Mortin-Toth, C.E. Robertson, L.M. Feazel, U. Rolle-Kampczyk, M. von Bergen, K.D. McCoy, A.J. Macpherson, and J.S. Danska. 2013. Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity. *Science* 339:1084-1088.
- Marleau, A.M., K.L. Summers, and B. Singh. 2008. Differential contributions of APC subsets to T cell activation in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 180:5235-5249.
- Martin, A.P., S. Rankin, S. Pitchford, I.F. Charo, G.C. Furtado, and S.A. Lira. 2008. Increased expression of CCL2 in insulin-producing cells of transgenic mice promotes mobilization of myeloid cells from the bone marrow, marked insulinitis, and diabetes. *Diabetes* 57:3025-3033.
- Mathieu, C., M. Waer, J. Laureys, O. Rutgeerts, and R. Bouillon. 1994. Prevention of autoimmune diabetes in NOD mice by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Diabetologia* 37:552-558.
- Matsuoka, K., J. Koreth, H.T. Kim, G. Bascug, S. McDonough, Y. Kawano, K. Murase, C. Cutler, V.T. Ho, E.P. Alyea, P. Armand, B.R. Blazar, J.H. Antin, R.J. Soiffer, and J. Ritz. 2013. Low-dose interleukin-2 therapy restores regulatory T cell homeostasis in patients with chronic graft-versus-host disease. *Science translational medicine* 5:179ra143.
- Matsushita, T., K. Yanaba, J.D. Bouaziz, M. Fujimoto, and T.F. Tedder. 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation* 118:3420-3430.
- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annual review of immunology* 12:991-1045.
- Mauri, C., and A. Bosma. 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annual review of immunology* 30:221-241.
- Mazzucchelli, R., J.A. Hixon, R. Spolski, X. Chen, W.Q. Li, V.L. Hall, J. Willette-Brown, A.A. Hurwitz, W.J. Leonard, and S.K. Durum. 2008. Development of regulatory T cells requires IL-7/Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood* 112:3283-3292.
- Mbunwe, E., B.J. Van der Auwera, I. Vermeulen, S. Demeester, A. Van Dalem, E.V. Balti, S. Van Aken, L. Derdelinckx, H. Dorchy, J. De Schepper, C. van Schravendijk, J.M. Wenzlau, J.C. Hutton, D. Pipeleers, I. Weets, and F.K. Gorus. 2013. HLA-A*24 is an independent predictor of 5-year progression to diabetes in autoantibody-positive first-degree relatives of type 1 diabetic patients. *Diabetes* 62:1345-1350.

- McLeod, J.G., S.R. Hammond, and J.F. Kurtzke. 2011. Migration and multiple sclerosis in immigrants to Australia from United Kingdom and Ireland: a reassessment. I. Risk of MS by age at immigration. *Journal of neurology* 258:1140-1149.
- Mellanby, R.J., D. Thomas, J.M. Phillips, and A. Cooke. 2007. Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunology* 121:15-28.
- Melli, K., R.S. Friedman, A.E. Martin, E.B. Finger, G. Miao, G.L. Szot, M.F. Krummel, and Q. Tang. 2009. Amplification of autoimmune response through induction of dendritic cell maturation in inflamed tissues. *J Immunol* 182:2590-2600.
- Menoret, S., C. Guillonnet, S. Bezie, L. Caron, I. Anegon, and X.L. Li. 2011. Phenotypic and functional characterization of CD8(+) T regulatory cells. *Methods Mol Biol* 677:63-83.
- Mensah-Brown, E.P., A. Shahin, M. Al-Shamisi, X. Wei, and M.L. Lukic. 2006. IL-23 leads to diabetes induction after subdiabetogenic treatment with multiple low doses of streptozotocin. *European journal of immunology* 36:216-223.
- Mezrich, J.D., J.H. Fechner, X. Zhang, B.P. Johnson, W.J. Burlingham, and C.A. Bradfield. 2010. An interaction between kynurenine and the aryl hydrocarbon receptor can generate regulatory T cells. *J Immunol* 185:3190-3198.
- Milanetti, F., M. Abinun, J.C. Voltarelli, and R.K. Burt. 2010. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for childhood autoimmune disease. *Pediatric clinics of North America* 57:239-271.
- Miyao, T., S. Floess, R. Setoguchi, H. Luche, H.J. Fehling, H. Waldmann, J. Huehn, and S. Hori. 2012. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* 36:262-275.
- Miyara, M., Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochoy, and S. Sakaguchi. 2009. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 30:899-911.
- Molinero, L.L., J. Yang, T. Gajewski, C. Abraham, M.A. Farrar, and M.L. Alegre. 2009. CARMA1 controls an early checkpoint in the thymic development of FoxP3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 182:6736-6743.
- Monti, P., M. Scirpoli, P. Maffi, N. Ghidoli, F. De Taddeo, F. Bertuzzi, L. Piemonti, M. Falcone, A. Secchi, and E. Bonifacio. 2008. Islet transplantation in patients with autoimmune diabetes induces homeostatic cytokines that expand autoreactive memory T cells. *The Journal of clinical investigation* 118:1806-1814.
- Moran, A., B. Bundy, D.J. Becker, L.A. DiMeglio, S.E. Gitelman, R. Goland, C.J. Greenbaum, K.C. Herold, J.B. Marks, P. Raskin, S. Sanda, D. Schatz, D.K. Wherrett, D.M. Wilson, J.P. Krischer, J.S. Skyler, L. Pickersgill, E. de Koning, A.G. Ziegler, B. Boehm, K. Badenhop, N. Schloot, J.F. Bak, P. Pozzilli, D. Mauricio, M.Y. Donath, L. Castano, A. Wagner, H.H. Lervang, H. Perrild, T. Mandrup-Poulsen, F. Pociot, and C.A. Dinarello. 2013. Interleukin-1 antagonism in type 1 diabetes of recent onset: two multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trials. *Lancet* 381:1905-1915.
- Moran, A.E., K.L. Holzapfel, Y. Xing, N.R. Cunningham, J.S. Maltzman, J. Punt, and K.A. Hogquist. 2011. T cell receptor signal strength in Treg and iNKT cell development demonstrated by a novel fluorescent reporter mouse. *The Journal of experimental medicine* 208:1279-1289.
- Moritani, M., K. Yoshimoto, S.F. Wong, C. Tanaka, T. Yamaoka, T. Sano, Y. Komagata, J. Miyazaki, H. Kikutani, and M. Itakura. 1998. Abrogation of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice and protection against effector lymphocytes by transgenic paracrine TGF-beta1. *The Journal of clinical investigation* 102:499-506.
- Mouly, E., K. Chemin, H.V. Nguyen, M. Chopin, L. Mesnard, M. Leite-de-Moraes, O. Burlen-defranoux, A. Bandeira, and J.C. Bories. 2010. The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells. *The Journal of experimental medicine* 207:2113-2125.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Mucida, D., Y. Park, G. Kim, O. Turovskaya, I. Scott, M. Kronenberg, and H. Cheroutre. 2007. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 317:256-260.
- Muir, A., A. Peck, M. Clare-Salzler, Y.H. Song, J. Cornelius, R. Luchetta, J. Krischer, and N. Maclaren. 1995. Insulin immunization of nonobese diabetic mice induces a protective insulitis characterized by diminished intraislet interferon-gamma transcription. *The Journal of clinical investigation* 95:628-634.
- Murawski, M.R., S.A. Litherland, M.J. Clare-Salzler, and A. Davoodi-Semiromi. 2006. Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1079:198-204.
- Myers, L., J.J. Joedicke, A.B. Carmody, R.J. Messer, G. Kassiotis, J.P. Dudley, U. Dittmer, and K.J. Hasenkrug. 2013. IL-2-Independent and TNF-alpha-Dependent Expansion of Vbeta5+ Natural Regulatory T Cells during Retrovirus Infection. *J Immunol*
- Nagamine, K., P. Peterson, H.S. Scott, J. Kudoh, S. Minoshima, M. Heino, K.J. Krohn, M.D. Lalioti, P.E. Mullis, S.E. Antonarakis, K. Kawasaki, S. Asakawa, F. Ito, and N. Shimizu. 1997. Positional cloning of the APECED gene. *Nature genetics* 17:393-398.
- Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* 194:629-644.
- Nakayama, M., N. Abiru, H. Moriyama, N. Babaya, E. Liu, D. Miao, L. Yu, D.R. Wegmann, J.C. Hutton, J.F. Elliott, and G.S. Eisenbarth. 2005. Prime role for an insulin epitope in the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Nature* 435:220-223.
- Nanto-Salonen, K., A. Kupila, S. Simell, H. Siljander, T. Salonsaari, A. Hekkala, S. Korhonen, R. Erkkola, J.I. Sipila, L. Haavisto, M. Siltala, J. Tuominen, J. Hakalax, H. Hyoty, J. Ilonen, R. Veijola, T. Simell, M. Knip, and O. Simell. 2008. Nasal insulin to prevent type 1 diabetes in children with HLA genotypes and autoantibodies conferring increased risk of disease: a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 372:1746-1755.
- Nejentsev, S., J.M. Howson, N.M. Walker, J. Szeszko, S.F. Field, H.E. Stevens, P. Reynolds, M. Hardy, E. King, J. Masters, J. Hulme, L.M. Maier, D. Smyth, R. Bailey, J.D. Cooper, G. Ribas, R.D. Campbell, D.G. Clayton, and J.A. Todd. 2007. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* 450:887-892.
- Nejentsev, S., N. Walker, D. Riches, M. Egholm, and J.A. Todd. 2009. Rare variants of IFIH1, a gene implicated in antiviral responses, protect against type 1 diabetes. *Science* 324:387-389.
- Nerup, J., P. Platz, O.O. Andersen, M. Christy, J. Lyngsoe, J.E. Poulsen, L.P. Ryder, L.S. Nielsen, M. Thomsen, and A. Svejgaard. 1974. HL-A antigens and diabetes mellitus. *Lancet* 2:864-866.
- Nie, H., Y. Zheng, R. Li, T.B. Guo, D. He, L. Fang, X. Liu, L. Xiao, X. Chen, B. Wan, Y.E. Chin, and J.Z. Zhang. 2013. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nature medicine* 19:322-328.
- Nishimura, H., Y. Agata, A. Kawasaki, M. Sato, S. Imamura, N. Minato, H. Yagita, T. Nakano, and T. Honjo. 1996. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *International immunology* 8:773-780.
- Nishimura, H., T. Okazaki, Y. Tanaka, K. Nakatani, M. Hara, A. Matsumori, S. Sasayama, A. Mizoguchi, H. Hiai, N. Minato, and T. Honjo. 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291:319-322.
- Niu, X., D. He, S. Deng, W. Li, Y. Xi, C. Xie, T. Jiang, J.Z. Zhang, C. Dong, and G. Chen. 2011. Regulatory immune responses induced by IL-1 receptor antagonist in rheumatoid arthritis. *Molecular immunology* 49:290-296.
- Noble, J.A., A.M. Valdes, M.D. Varney, J.A. Carlson, P. Moonsamy, A.L. Fear, J.A. Lane, E. Lavant, R. Rappner, A. Louey, P. Concannon, J.C. Mychaleckyj, and H.A. Erlich. 2010. HLA class I and genetic susceptibility to type 1 diabetes: results from the Type 1 Diabetes Genetics Consortium. *Diabetes* 59:2972-2979.

- Notley, C.A., and M.R. Ehrenstein. 2010. The yin and yang of regulatory T cells and inflammation in RA. *Nature reviews. Rheumatology* 6:572-577.
- Novak, J., T. Griseri, L. Beaudoin, and A. Lehuen. 2007. Regulation of type 1 diabetes by NKT cells. *International reviews of immunology* 26:49-72.
- Nowak, M., and J. Stein-Streilein. 2007. Invariant NKT cells and tolerance. *International reviews of immunology* 26:95-119.
- Nurieva, R.I., Y. Chung, D. Hwang, X.O. Yang, H.S. Kang, L. Ma, Y.H. Wang, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity* 29:138-149.
- O'Connor, R.A., and S.M. Anderton. 2008. Foxp3⁺ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *Journal of neuroimmunology* 193:1-11.
- O'Garra, A., and P. Vieira. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature reviews. Immunology* 7:425-428.
- O'Gorman, W.E., H. Dooks, S.H. Thorne, W.F. Kuswanto, E.F. Simonds, P.O. Krutzik, G.P. Nolan, and A.K. Abbas. 2009. The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells. *J Immunol* 183:332-339.
- O'Sullivan, B.J., H.E. Thomas, S. Pai, P. Santamaria, Y. Iwakura, R.J. Steptoe, T.W. Kay, and R. Thomas. 2006. IL-1 beta breaks tolerance through expansion of CD25⁺ effector T cells. *J Immunol* 176:7278-7287.
- Ochando, J.C., C. Homma, Y. Yang, A. Hidalgo, A. Garin, F. Tacke, V. Angeli, Y. Li, P. Boros, Y. Ding, R. Jessberger, G. Trinchieri, S.A. Lira, G.J. Randolph, and J.S. Bromberg. 2006. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nature immunology* 7:652-662.
- Oderup, C., L. Cederbom, A. Makowska, C.M. Cilio, and F. Ivars. 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 118:240-249.
- Ogasawara, K., J.A. Hamerman, H. Hsin, S. Chikuma, H. Bour-Jordan, T. Chen, T. Pertel, C. Carnaud, J.A. Bluestone, and L.L. Lanier. 2003. Impairment of NK cell function by NKG2D modulation in NOD mice. *Immunity* 18:41-51.
- Ohnmacht, C., A. Pullner, S.B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, and D. Voehringer. 2009. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 206:549-559.
- Oldstone, M.B. 1988. Prevention of type I diabetes in nonobese diabetic mice by virus infection. *Science* 239:500-502.
- Onishi, Y., Z. Fehervari, T. Yamaguchi, and S. Sakaguchi. 2008. Foxp3⁺ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:10113-10118.
- Orban, T., B. Bundy, D.J. Becker, L.A. DiMeglio, S.E. Gitelman, R. Goland, P.A. Gottlieb, C.J. Greenbaum, J.B. Marks, R. Monzavi, A. Moran, P. Raskin, H. Rodriguez, W.E. Russell, D. Schatz, D. Wherrett, D.M. Wilson, J.P. Krischer, and J.S. Skyler. 2011. Co-stimulation modulation with abatacept in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 378:412-419.
- Orban, T., K. Farkas, H. Jalahej, J. Kis, A. Treszl, B. Falk, H. Reijonen, J. Wolfsdorf, A. Ricker, J.B. Matthews, N. Tchao, P. Sayre, and P. Bianchine. 2010. Autoantigen-specific regulatory T cells induced in patients with type 1 diabetes mellitus by insulin B-chain immunotherapy. *Journal of autoimmunity* 34:408-415.
- Ouyang, W., O. Beckett, R.A. Flavell, and M.O. Li. 2009. An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity* 30:358-371.
- Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma, and M.O. Li. 2010a. Transforming growth factor-beta signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. *Immunity* 32:642-653.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ouyang, W., O. Beckett, Q. Ma, J.H. Paik, R.A. DePinho, and M.O. Li. 2010b. Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature immunology* 11:618-627.
- Ouyang, W., W. Liao, C.T. Luo, N. Yin, M. Huse, M.V. Kim, M. Peng, P. Chan, Q. Ma, Y. Mo, D. Meijer, K. Zhao, A.Y. Rudensky, G. Atwal, M.Q. Zhang, and M.O. Li. 2012. Novel Foxo1-dependent transcriptional programs control T(reg) cell function. *Nature* 491:554-559.
- Pacholczyk, R., J. Kern, N. Singh, M. Iwashima, P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2007. Nonself-antigens are the cognate specificities of Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunity* 27:493-504.
- Pakala, S.V., M. Chivetta, C.B. Kelly, and J.D. Katz. 1999. In autoimmune diabetes the transition from benign to pernicious insulinitis requires an islet cell response to tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine* 189:1053-1062.
- Pallotta, M.T., C. Orabona, C. Volpi, C. Vacca, M.L. Belladonna, R. Bianchi, G. Servillo, C. Brunacci, M. Calvitti, S. Bicciato, E.M. Mazza, L. Boon, F. Grassi, M.C. Fioretti, F. Fallarino, P. Puccetti, and U. Grohmann. 2011. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature immunology* 12:870-878.
- Pandiyar, P., L. Zheng, S. Ishihara, J. Reed, and M.J. Lenardo. 2007. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nature immunology* 8:1353-1362.
- Parker, M.J., S. Xue, J.J. Alexander, C.H. Wasserfall, M.L. Campbell-Thompson, M. Battaglia, S. Gregori, C.E. Mathews, S. Song, M. Troutt, S. Eisenbeis, J. Williams, D.A. Schatz, M.J. Haller, and M.A. Atkinson. 2009. Immune depletion with cellular mobilization imparts immunoregulation and reverses autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Diabetes* 58:2277-2284.
- Paxson, J.A., J.G. Weber, and A. Kulczycki, Jr. 1997. Cow's milk-free diet does not prevent diabetes in NOD mice. *Diabetes* 46:1711-1717.
- Pende, M., S.C. Kozma, M. Jaquet, V. Oorschot, R. Burcelin, Y. Le Marchand-Brustel, J. Klumperman, B. Thorens, and G. Thomas. 2000. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice. *Nature* 408:994-997.
- Pescovitz, M.D., C.J. Greenbaum, H. Krause-Steinrauf, D.J. Becker, S.E. Gitelman, R. Goland, P.A. Gottlieb, J.B. Marks, P.F. McGee, A.M. Moran, P. Raskin, H. Rodriguez, D.A. Schatz, D. Wherrett, D.M. Wilson, J.M. Lachin, and J.S. Skyler. 2009. Rituximab, B-lymphocyte depletion, and preservation of beta-cell function. *The New England journal of medicine* 361:2143-2152.
- Piccirillo, C.A., J.J. Letterio, A.M. Thornton, R.S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E.M. Shevach. 2002. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *The Journal of experimental medicine* 196:237-246.
- Polanczyk, M.J., C. Hopke, A.A. Vandenbark, and H. Offner. 2006. Estrogen-mediated immunomodulation involves reduced activation of effector T cells, potentiation of Treg cells, and enhanced expression of the PD-1 costimulatory pathway. *Journal of neuroscience research* 84:370-378.
- Polychronakos, C., and Q. Li. 2011. Understanding type 1 diabetes through genetics: advances and prospects. *Nature reviews. Genetics* 12:781-792.
- Pop, S.M., C.P. Wong, D.A. Culton, S.H. Clarke, and R. Tisch. 2005. Single cell analysis shows decreasing FoxP3 and TGFbeta1 coexpressing CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 201:1333-1346.
- Powrie, F., and D. Mason. 1990. OX-22high CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *The Journal of experimental medicine* 172:1701-1708.
- Prevot, N., C. Briet, H. Lassmann, I. Tardivel, E. Roy, J. Morin, T.W. Mak, A. Tafuri, and C. Boitard. 2010. Abrogation of ICOS/ICOS ligand costimulation in NOD mice results in autoimmune deviation toward the neuromuscular system. *European journal of immunology* 40:2267-2276.

- Qureshi, O.S., Y. Zheng, K. Nakamura, K. Attridge, C. Manzotti, E.M. Schmidt, J. Baker, L.E. Jeffery, S. Kaur, Z. Briggs, T.Z. Hou, C.E. Futter, G. Anderson, L.S. Walker, and D.M. Sansom. 2011. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332:600-603.
- Rabinovitch, A., W.L. Suarez-Pinzon, A.M. Shapiro, R.V. Rajotte, and R. Power. 2002. Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 51:638-645.
- Rauert, H., A. Wicovsky, N. Muller, D. Siegmund, V. Spindler, J. Waschke, C. Kneitz, and H. Wajant. 2010. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *The Journal of biological chemistry* 285:7394-7404.
- Raz, I., A. Avron, M. Tamir, M. Metzger, L. Symer, R. Eldor, I.R. Cohen, and D. Elias. 2007. Treatment of new-onset type 1 diabetes with peptide DiaPep277 is safe and associated with preserved beta-cell function: extension of a randomized, double-blind, phase II trial. *Diabetes/metabolism research and reviews* 23:292-298.
- Reichardt, W., C. Durr, D. von Elverfeldt, E. Juttner, U.V. Gerlach, M. Yamada, B. Smith, R.S. Negrin, and R. Zeiser. 2008. Impact of mammalian target of rapamycin inhibition on lymphoid homing and tolerogenic function of nanoparticle-labeled dendritic cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Immunol* 181:4770-4779.
- Reizis, B., A. Bunin, H.S. Ghosh, K.L. Lewis, and V. Sisirak. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annual review of immunology* 29:163-183.
- Ring, A.M., J.X. Lin, D. Feng, S. Mitra, M. Rickert, G.R. Bowman, V.S. Pande, P. Li, I. Moraga, R. Spolski, E. Ozkan, W.J. Leonard, and K.C. Garcia. 2012. Mechanistic and structural insight into the functional dichotomy between IL-2 and IL-15. *Nature immunology* 13:1187-1195.
- Robb, R.J., K.E. Lineburg, R.D. Kuns, Y.A. Wilson, N.C. Raffelt, S.D. Olver, A. Varelias, K.A. Alexander, B.E. Teal, T. Sparwasser, G.J. Hammerling, K.A. Markey, M. Koyama, A.D. Clouston, C.R. Engwerda, G.R. Hill, and K.P. MacDonald. 2012. Identification and expansion of highly suppressive CD8(+)FoxP3(+) regulatory T cells after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 119:5898-5908.
- Roberts, A.B., M.B. Sporn, R.K. Assoian, J.M. Smith, N.S. Roche, L.M. Wakefield, U.I. Heine, L.A. Liotta, V. Falanga, J.H. Kehrl, and et al. 1986. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:4167-4171.
- Rochman, Y., R. Spolski, and W.J. Leonard. 2009. New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. *Nature reviews. Immunology* 9:480-490.
- Rodacki, M., B. Svoren, V. Butty, W. Besse, L. Laffel, C. Benoist, and D. Mathis. 2007. Altered natural killer cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes* 56:177-185.
- Rogner, U.C., C. Boitard, J. Morin, E. Melanitou, and P. Avner. 2001. Three loci on mouse chromosome 6 influence onset and final incidence of type I diabetes in NOD.C3H congenic strains. *Genomics* 74:163-171.
- Rogner, U.C., F. Lepault, M.C. Gagnerault, D. Vallois, J. Morin, P. Avner, and C. Boitard. 2006. The diabetes type 1 locus Idd6 modulates activity of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Diabetes* 55:186-192.
- Rook, G.A. 2012. Hygiene hypothesis and autoimmune diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology* 42:5-15.
- Rottman, J.B., T. Smith, J.R. Tonra, K. Ganley, T. Bloom, R. Silva, B. Pierce, J.C. Gutierrez-Ramos, E. Ozkaynak, and A.J. Coyle. 2001. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nature immunology* 2:605-611.
- Rubtsov, Y.P., R.E. Niec, S. Josefowicz, L. Li, J. Darce, D. Mathis, C. Benoist, and A.Y. Rudensky. 2010. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* 329:1667-1671.
- Rubtsov, Y.P., J.P. Rasmussen, E.Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W.R. Henderson, Jr., W. Muller, and A.Y. Rudensky. 2008. Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28:546-558.

- Ruprecht, C.R., M. Gattorno, F. Ferlito, A. Gregorio, A. Martini, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2005. Coexpression of CD25 and CD27 identifies FoxP3+ regulatory T cells in inflamed synovia. *The Journal of experimental medicine* 201:1793-1803.
- Rutella, S., G. Bonanno, L. Pierelli, A. Mariotti, E. Capoluongo, A.M. Contemi, F. Ameglio, A. Curti, D.G. De Ritis, M.T. Voso, A. Perillo, S. Mancuso, G. Scambia, R.M. Lemoli, and G. Leone. 2004. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN- α . *European journal of immunology* 34:1291-1302.
- Saadoun, D., M. Rosenzweig, F. Joly, A. Six, F. Carrat, V. Thibault, D. Sene, P. Cacoub, and D. Klatzmann. 2011. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *The New England journal of medicine* 365:2067-2077.
- Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A.C. Feller, and I. Horak. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* 75:253-261.
- Sakaguchi, S., K. Fukuma, K. Kuribayashi, and T. Masuda. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *The Journal of experimental medicine* 161:72-87.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
- Sakata, A., K. Kuwahara, T. Ohmura, S. Inui, and N. Sakaguchi. 1999. Involvement of a rapamycin-sensitive pathway in CD40-mediated activation of murine B cells in vitro. *Immunology letters* 68:301-309.
- Salama, A.D., T. Chitnis, J. Imitola, M.J. Ansari, H. Akiba, F. Tushima, M. Azuma, H. Yagita, M.H. Sayegh, and S.J. Khoury. 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 198:71-78.
- Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12:431-440.
- Sansom, D.M., and L.S. Walker. 2006. The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunological reviews* 212:131-148.
- Sarris, M., K.G. Andersen, F. Randow, L. Mayr, and A.G. Betz. 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28:402-413.
- Sato, S., N. Ono, D.A. Steeber, D.S. Pisetsky, and T.F. Tedder. 1996. CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *J Immunol* 157:4371-4378.
- Saudek, F., T. Havrdova, P. Boucek, L. Karasova, P. Novota, and J. Skibova. 2004. Polyclonal anti-T-cell therapy for type 1 diabetes mellitus of recent onset. *The review of diabetic studies : RDS* 1:80-88.
- Sauer, S., L. Bruno, A. Hertweck, D. Finlay, M. Leleu, M. Spivakov, Z.A. Knight, B.S. Cobb, D. Cantrell, E. O'Connor, K.M. Shokat, A.G. Fisher, and M. Merckenschlager. 2008. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:7797-7802.
- Schallenberg, S., P.Y. Tsai, J. Riewaldt, and K. Kretschmer. 2010. Identification of an immediate Foxp3(-) precursor to Foxp3(+) regulatory T cells in peripheral lymphoid organs of nonmanipulated mice. *The Journal of experimental medicine* 207:1393-1407.
- Schlenner, S.M., B. Weigmann, Q. Ruan, Y. Chen, and H. von Boehmer. 2012. Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *The Journal of experimental medicine* 209:1529-1535.

- Schmidt, E.M., C.J. Wang, G.A. Ryan, L.E. Clough, O.S. Qureshi, M. Goodall, A.K. Abbas, A.H. Sharpe, D.M. Sansom, and L.S. Walker. 2009. Ctla-4 controls regulatory T cell peripheral homeostasis and is required for suppression of pancreatic islet autoimmunity. *J Immunol* 182:274-282.
- Schuster, M., R. Glauben, C. Plaza-Sirvent, L. Schreiber, M. Annemann, S. Floess, A.A. Kuhl, L.K. Clayton, T. Sparwasser, K. Schulze-Osthoff, K. Pfeffer, J. Huehn, B. Siegmund, and I. Schmitz. 2012. IkappaB(NS) protein mediates regulatory T cell development via induction of the Foxp3 transcription factor. *Immunity* 37:998-1008.
- Sehgal, S.N. 2003. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplantation proceedings* 35:7S-14S.
- Sela, U., P. Olds, A. Park, S.J. Schlesinger, and R.M. Steinman. 2011. Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice. *The Journal of experimental medicine* 208:2489-2496.
- Semple, K., A. Nguyen, Y. Yu, H. Wang, C. Anasetti, and X.Z. Yu. 2011. Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling. *Blood* 117:3096-3103.
- Sethi, G., B. Sung, and B.B. Aggarwal. 2008. TNF: a master switch for inflammation to cancer. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 13:5094-5107.
- Sgouroudis, E., A. Albanese, and C.A. Piccirillo. 2008. Impact of protective IL-2 allelic variants on CD4+ Foxp3+ regulatory T cell function in situ and resistance to autoimmune diabetes in NOD mice. *J Immunol* 181:6283-6292.
- Shapiro, A.M., W.L. Suarez-Pinzon, R. Power, and A. Rabinovitch. 2002. Combination therapy with low dose sirolimus and tacrolimus is synergistic in preventing spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Diabetologia* 45:224-230.
- Sharma, M.D., B. Baban, P. Chandler, D.Y. Hou, N. Singh, H. Yagita, M. Azuma, B.R. Blazar, A.L. Mellor, and D.H. Munn. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of clinical investigation* 117:2570-2582.
- Shechter, R., A. London, and M. Schwartz. 2013. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nature reviews. Immunology* 13:206-218.
- Sherry, N., W. Hagopian, J. Ludvigsson, S.M. Jain, J. Wahlen, R.J. Ferry, Jr., B. Bode, S. Aronoff, C. Holland, D. Carlin, K.L. King, R.L. Wilder, S. Pillemer, E. Bonvini, S. Johnson, K.E. Stein, S. Koenig, K.C. Herold, and A.G. Daifotis. 2011. Teplizumab for treatment of type 1 diabetes (Protege study): 1-year results from a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 378:487-497.
- Shi, L.Z., R. Wang, G. Huang, P. Vogel, G. Neale, D.R. Green, and H. Chi. 2011. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *The Journal of experimental medicine* 208:1367-1376.
- Shih, F.F., L. Mandik-Nayak, B.T. Wipke, and P.M. Allen. 2004. Massive thymic deletion results in systemic autoimmunity through elimination of CD4+ CD25+ T regulatory cells. *The Journal of experimental medicine* 199:323-335.
- Shimizu, J., S. Yamazaki, T. Takahashi, Y. Ishida, and S. Sakaguchi. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nature immunology* 3:135-142.
- Shin, H.J., J. Baker, D.B. Leveson-Gower, A.T. Smith, E.I. Segal, and R.S. Negrin. 2011. Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 118:2342-2350.
- Shull, M.M., I. Ormsby, A.B. Kier, S. Pawlowski, R.J. Diebold, M. Yin, R. Allen, C. Sidman, G. Proetzel, D. Calvin, and et al. 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699.

- Simon, G., M. Parker, V. Ramiya, C. Wasserfall, Y. Huang, D. Bresson, R.F. Schwartz, M. Campbell-Thompson, L. Tenace, T. Brusko, S. Xue, A. Scaria, M. Lukason, S. Eisenbeis, J. Williams, M. Clare-Salzler, D. Schatz, B. Kaplan, M. Von Herrath, K. Womer, and M.A. Atkinson. 2008. Murine antithymocyte globulin therapy alters disease progression in NOD mice by a time-dependent induction of immunoregulation. *Diabetes* 57:405-414.
- Simoni, Y., A.S. Gautron, L. Beaudoin, L.C. Bui, M.L. Michel, X. Coumoul, G. Eberl, M. Leite-de-Moraes, and A. Lehuen. 2011. NOD mice contain an elevated frequency of iNKT17 cells that exacerbate diabetes. *European journal of immunology* 41:3574-3585.
- Sinclair, L.V., D. Finlay, C. Feijoo, G.H. Cornish, A. Gray, A. Ager, K. Okkenhaug, T.J. Hagenbeek, H. Spits, and D.A. Cantrell. 2008. Phosphatidylinositol-3-OH kinase and nutrient-sensing mTOR pathways control T lymphocyte trafficking. *Nature immunology* 9:513-521.
- Sitrin, J., A. Ring, K.C. Garcia, C. Benoist, and D. Mathis. 2013. Regulatory T cells control NK cells in an insulinitic lesion by depriving them of IL-2. *The Journal of experimental medicine*
- Smelt, M.J., M.M. Faas, B.J. de Haan, C. Draijer, G.C. Hugenholtz, A. de Haan, M.A. Engelse, E.J. de Koning, and P. de Vos. 2012. Susceptibility of human pancreatic beta cells for cytomegalovirus infection and the effects on cellular immunogenicity. *Pancreas* 41:39-49.
- Smith, F.O., S.G. Downey, J.A. Klapper, J.C. Yang, R.M. Sherry, R.E. Royal, U.S. Kammula, M.S. Hughes, N.P. Restifo, C.L. Levy, D.E. White, S.M. Steinberg, and S.A. Rosenberg. 2008. Treatment of metastatic melanoma using interleukin-2 alone or in conjunction with vaccines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14:5610-5618.
- Smith, K.A. 1988. Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science* 240:1169-1176.
- Smyth, D., J.D. Cooper, J.E. Collins, J.M. Heward, J.A. Franklyn, J.M. Howson, A. Vella, S. Nutland, H.E. Rance, L. Maier, B.J. Barratt, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, D.A. Savage, D.B. Dunger, B. Widmer, D.P. Strachan, S.M. Ring, N. Walker, D.G. Clayton, R.C. Twells, S.C. Gough, and J.A. Todd. 2004. Replication of an association between the lymphoid tyrosine phosphatase locus (LYP/PTPN22) with type 1 diabetes, and evidence for its role as a general autoimmunity locus. *Diabetes* 53:3020-3023.
- Snarski, E., A. Milczarczyk, T. Torosian, M. Paluszewska, E. Urbanowska, M. Krol, P. Boguradzki, K. Jedynasty, E. Franek, and W. Wiktor-Jedrzejczak. 2011. Independence of exogenous insulin following immunoablation and stem cell reconstitution in newly diagnosed diabetes type I. *Bone marrow transplantation* 46:562-566.
- So, T., and M. Croft. 2007. Cutting edge: OX40 inhibits TGF-beta- and antigen-driven conversion of naive CD4 T cells into CD25+Foxp3+ T cells. *J Immunol* 179:1427-1430.
- Song, K., H. Wang, T.L. Krebs, and D. Danielpour. 2006. Novel roles of Akt and mTOR in suppressing TGF-beta/ALK5-mediated Smad3 activation. *The EMBO journal* 25:58-69.
- Stadinski, B.D., T. Delong, N. Reisdorph, R. Reisdorph, R.L. Powell, M. Armstrong, J.D. Piganelli, G. Barbour, B. Bradley, F. Crawford, P. Marrack, S.K. Mahata, J.W. Kappler, and K. Haskins. 2010. Chromogranin A is an autoantigen in type 1 diabetes. *Nature immunology* 11:225-231.
- Stauber, D.J., E.W. Debler, P.A. Horton, K.A. Smith, and I.A. Wilson. 2006. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:2788-2793.
- Steck, A.K., W. Zhang, T.L. Bugawan, K.J. Barriga, A. Blair, H.A. Erlich, G.S. Eisenbarth, J.M. Norris, and M.J. Rewers. 2009. Do non-HLA genes influence development of persistent islet autoimmunity and type 1 diabetes in children with high-risk HLA-DR,DQ genotypes? *Diabetes* 58:1028-1033.
- Stephens, G.L., R.S. McHugh, M.J. Whitters, D.A. Young, D. Luxenberg, B.M. Carreno, M. Collins, and E.M. Shevach. 2004. Engagement of glucocorticoid-induced TNFR family-related receptor on effector T cells by its ligand mediates resistance to suppression by CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 173:5008-5020.
- Stephens, L.A., C. Mottet, D. Mason, and F. Powrie. 2001. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *European journal of immunology* 31:1247-1254.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Strauss, L., C. Bergmann, M.J. Szczepanski, S. Lang, J.M. Kirkwood, and T.L. Whiteside. 2008. Expression of ICOS on human melanoma-infiltrating CD4+CD25highFoxp3+ T regulatory cells: implications and impact on tumor-mediated immune suppression. *J Immunol* 180:2967-2980.
- Suffia, I., S.K. Reckling, G. Salay, and Y. Belkaid. 2005. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 174:5444-5455.
- Suffner, J., K. Hochweller, M.C. Kuhnle, X. Li, R.A. Kroccek, N. Garbi, and G.J. Hammerling. 2010. Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3+ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice. *J Immunol* 184:1810-1820.
- Sugimoto, N., T. Oida, K. Hirota, K. Nakamura, T. Nomura, T. Uchiyama, and S. Sakaguchi. 2006. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *International immunology* 18:1197-1209.
- Sun, Y., X. Lin, H.M. Chen, Q. Wu, S.K. Subudhi, L. Chen, and Y.X. Fu. 2002. Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 168:1457-1465.
- Suri, A., J.J. Walters, M.L. Gross, and E.R. Unanue. 2005. Natural peptides selected by diabetogenic DQ8 and murine I-A(g7) molecules show common sequence specificity. *The Journal of clinical investigation* 115:2268-2276.
- Suzuki, H., T.M. Kundig, C. Furlonger, A. Wakeham, E. Timms, T. Matsuyama, R. Schmits, J.J. Simard, P.S. Ohashi, H. Griesser, and et al. 1995. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* 268:1472-1476.
- Swee, L.K., N. Bosco, B. Malissen, R. Ceredig, and A. Rolink. 2009. Expansion of peripheral naturally occurring T regulatory cells by Fms-like tyrosine kinase 3 ligand treatment. *Blood* 113:6277-6287.
- Sykes, M., M.L. Romick, and D.H. Sachs. 1990. Interleukin 2 prevents graft-versus-host disease while preserving the graft-versus-leukemia effect of allogeneic T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:5633-5637.
- Tadokoro, C.E., G. Shakhar, S. Shen, Y. Ding, A.C. Lino, A. Maraver, J.J. Lafaille, and M.L. Dustin. 2006. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* 203:505-511.
- Tai, X., M. Cowan, L. Feigenbaum, and A. Singer. 2005. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nature immunology* 6:152-162.
- Takagi, H., T. Fukaya, K. Eizumi, Y. Sato, K. Sato, A. Shibasaki, H. Otsuka, A. Hijikata, T. Watanabe, O. Ohara, T. Kaisho, and B. Malissen. 2011. Plasmacytoid dendritic cells are crucial for the initiation of inflammation and T cell immunity in vivo. *Immunity* 35:958-971.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, M. Toda, N. Sakaguchi, M. Itoh, M. Iwata, J. Shimizu, and S. Sakaguchi. 1998. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *International immunology* 10:1969-1980.
- Takahashi, T., T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T.W. Mak, and S. Sakaguchi. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *The Journal of experimental medicine* 192:303-310.
- Takeda, I., S. Ine, N. Killeen, L.C. Ndhlovu, K. Murata, S. Satomi, K. Sugamura, and N. Ishii. 2004. Distinct roles for the OX40-OX40 ligand interaction in regulatory and nonregulatory T cells. *J Immunol* 172:3580-3589.
- Tang, Q., J.Y. Adams, C. Penaranda, K. Melli, E. Piaggio, E. Sgouroudis, C.A. Piccirillo, B.L. Salomon, and J.A. Bluestone. 2008. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 28:687-697.
- Tang, Q., J.Y. Adams, A.J. Tooley, M. Bi, B.T. Fife, P. Serra, P. Santamaria, R.M. Locksley, M.F. Krummel, and J.A. Bluestone. 2006. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nature immunology* 7:83-92.

- Tang, Q., E.K. Boden, K.J. Henriksen, H. Bour-Jordan, M. Bi, and J.A. Bluestone. 2004a. Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *European journal of immunology* 34:2996-3005.
- Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, and J.A. Bluestone. 2004b. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *The Journal of experimental medicine* 199:1455-1465.
- Tang, Q., K.J. Henriksen, E.K. Boden, A.J. Tooley, J. Ye, S.K. Subudhi, X.X. Zheng, T.B. Strom, and J.A. Bluestone. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 171:3348-3352.
- Thomson, A.W., H.R. Turnquist, and G. Raimondi. 2009. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature reviews. Immunology* 9:324-337.
- Thornton, A.M., P.E. Kory, D.Q. Tran, E.A. Wohlfert, P.E. Murray, Y. Belkaid, and E.M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 184:3433-3441.
- Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of experimental medicine* 188:287-296.
- Thornton, A.M., and E.M. Shevach. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol* 164:183-190.
- Tivol, E.A., F. Borriello, A.N. Schweitzer, W.P. Lynch, J.A. Bluestone, and A.H. Sharpe. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3:541-547.
- Todd, J.A., N.M. Walker, J.D. Cooper, D.J. Smyth, K. Downes, V. Plagnol, R. Bailey, S. Nejentsev, S.F. Field, F. Payne, C.E. Lowe, J.S. Szeszko, J.P. Hafler, L. Zeitels, J.H. Yang, A. Vella, S. Nutland, H.E. Stevens, H. Schuilenburg, G. Coleman, M. Maisuria, W. Meadows, L.J. Smink, B. Healy, O.S. Burren, A.A. Lam, N.R. Ovington, J. Allen, E. Adlem, H.T. Leung, C. Wallace, J.M. Howson, C. Guja, C. Ionescu-Tirgoviste, M.J. Simmonds, J.M. Heward, S.C. Gough, D.B. Dunger, L.S. Wicker, and D.G. Clayton. 2007. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nature genetics* 39:857-864.
- Tomala, J., H. Chmelova, T. Mrkvan, B. Rihova, and M. Kovar. 2009. In vivo expansion of activated naive CD8+ T cells and NK cells driven by complexes of IL-2 and anti-IL-2 monoclonal antibody as novel approach of cancer immunotherapy. *J Immunol* 183:4904-4912.
- Tomura, M., T. Honda, H. Tanizaki, A. Otsuka, G. Egawa, Y. Tokura, H. Waldmann, S. Hori, J.G. Cyster, T. Watanabe, Y. Miyachi, O. Kanagawa, and K. Kabashima. 2010. Activated regulatory T cells are the major T cell type emigrating from the skin during a cutaneous immune response in mice. *The Journal of clinical investigation* 120:883-893.
- Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M.L. Tykocinski, M.I. Greene, and M. Tone. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nature immunology* 9:194-202.
- Tran, D.Q., J. Andersson, D. Hardwick, L. Bebris, G.G. Illei, and E.M. Shevach. 2009a. Selective expression of latency-associated peptide (LAP) and IL-1 receptor type I/II (CD121a/CD121b) on activated human FOXP3+ regulatory T cells allows for their purification from expansion cultures. *Blood* 113:5125-5133.
- Tran, D.Q., D.D. Glass, G. Uzel, D.A. Darnell, C. Spalding, S.M. Holland, and E.M. Shevach. 2009b. Analysis of adhesion molecules, target cells, and role of IL-2 in human FOXP3+ regulatory T cell suppressor function. *J Immunol* 182:2929-2938.
- Travis, M.A., B. Reizis, A.C. Melton, E. Masteller, Q. Tang, J.M. Proctor, Y. Wang, X. Bernstein, X. Huang, L.F. Reichardt, J.A. Bluestone, and D. Sheppard. 2007. Loss of integrin alpha(v)beta8 on dendritic cells causes autoimmunity and colitis in mice. *Nature* 449:361-365.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Tsai, S., A. Shameli, J. Yamanouchi, X. Clemente-Casares, J. Wang, P. Serra, Y. Yang, Z. Medarova, A. Moore, and P. Santamaria. 2010. Reversal of autoimmunity by boosting memory-like autoregulatory T cells. *Immunity* 32:568-580.
- Turley, S., L. Poirot, M. Hattori, C. Benoist, and D. Mathis. 2003. Physiological beta cell death triggers priming of self-reactive T cells by dendritic cells in a type-1 diabetes model. *The Journal of experimental medicine* 198:1527-1537.
- Turnquist, H.R., G. Raimondi, A.F. Zahorchak, R.T. Fischer, Z. Wang, and A.W. Thomson. 2007. Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4+ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3+ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance. *J Immunol* 178:7018-7031.
- Undlien, D.E., T. Friede, H.G. Rammensee, G. Joner, K. Dahl-Jorgensen, O. Sovik, H.E. Akselsen, I. Knutsen, K.S. Ronningen, and E. Thorsby. 1997. HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. *Diabetes* 46:143-149.
- Uno, S., A. Imagawa, K. Okita, K. Sayama, M. Moriwaki, H. Iwahashi, K. Yamagata, S. Tamura, Y. Matsuzawa, T. Hanafusa, J. Miyagawa, and I. Shimomura. 2007. Macrophages and dendritic cells infiltrating islets with or without beta cells produce tumour necrosis factor-alpha in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* 50:596-601.
- Urbanek-Ruiz, I., P.J. Ruiz, V. Paragas, H. Garren, L. Steinman, and C.G. Fathman. 2001. Immunization with DNA encoding an immunodominant peptide of insulin prevents diabetes in NOD mice. *Clin Immunol* 100:164-171.
- Valencia, X., G. Stephens, R. Goldbach-Mansky, M. Wilson, E.M. Shevach, and P.E. Lipsky. 2006. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* 108:253-261.
- Valle, A., G.M. Giamporcaro, M. Scavini, A. Stabilini, P. Grogan, E. Bianconi, G. Sebastiani, M. Masini, N. Maugeri, L. Porretti, R. Bonfanti, F. Meschi, M. De Pellegrin, A. Lesma, S. Rossini, L. Piemonti, P. Marchetti, F. Dotta, E. Bosi, and M. Battaglia. 2013. Reduced circulating neutrophils precedes and accompanies type 1 diabetes. *Diabetes*
- Valle, A., T. Jofra, A. Stabilini, M. Atkinson, M.G. Roncarolo, and M. Battaglia. 2009. Rapamycin prevents and breaks the anti-CD3-induced tolerance in NOD mice. *Diabetes* 58:875-881.
- Vamosi, G., A. Bodnar, G. Vereb, A. Jenei, C.K. Goldman, J. Langowski, K. Toth, L. Matyus, J. Szollosi, T.A. Waldmann, and S. Damjanovich. 2004. IL-2 and IL-15 receptor alpha-subunits are coexpressed in a supramolecular receptor cluster in lipid rafts of T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11082-11087.
- van Belle, T.L., K.T. Coppieters, and M.G. von Herrath. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiological reviews* 91:79-118.
- van Santen, H.M., C. Benoist, and D. Mathis. 2004. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *The Journal of experimental medicine* 200:1221-1230.
- Vang, K.B., J. Yang, S.A. Mahmud, M.A. Burchill, A.L. Vegoe, and M.A. Farrar. 2008. IL-2, -7, and -15, but not thymic stromal lymphopoietin, redundantly govern CD4+Foxp3+ regulatory T cell development. *J Immunol* 181:3285-3290.
- Vella, A., J.D. Cooper, C.E. Lowe, N. Walker, S. Nutland, B. Widmer, R. Jones, S.M. Ring, W. McArdle, M.E. Pembrey, D.P. Strachan, D.B. Dunger, R.C. Twells, D.G. Clayton, and J.A. Todd. 2005. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *American journal of human genetics* 76:773-779.
- Verdaguer, J., D. Schmidt, A. Amrani, B. Anderson, N. Averill, and P. Santamaria. 1997. Spontaneous autoimmune diabetes in monoclonal T cell nonobese diabetic mice. *The Journal of experimental medicine* 186:1663-1676.
- Vezina, C., A. Kudelski, and S.N. Sehgal. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* 28:721-726.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Vokaer, B., L.M. Charbonnier, P.H. Lemaitre, and A. Le Moine. 2012. Impact of interleukin-2-expanded regulatory T cells in various allogeneic combinations on mouse skin graft survival. *Transplantation proceedings* 44:2840-2844.
- Voltarelli, J.C., and C.E. Couri. 2009. Stem cell transplantation for type 1 diabetes mellitus. *Diabetology & metabolic syndrome* 1:4.
- von Herrath, M.G., R.S. Fujinami, and J.L. Whitton. 2003. Microorganisms and autoimmunity: making the barren field fertile? *Nature reviews. Microbiology* 1:151-157.
- Vu, M.D., X. Xiao, W. Gao, N. Degauque, M. Chen, A. Kroemer, N. Killeen, N. Ishii, and X.C. Li. 2007. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood* 110:2501-2510.
- Wakamatsu, E., D. Mathis, and C. Benoist. 2013. Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110:1023-1028.
- Waldron-Lynch, F., and K.C. Herold. 2011. Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic beta-cell function in type 1 diabetes. *Nature reviews. Drug discovery* 10:439-452.
- Walker, L.S. 2009. Regulatory T cells overturned: the effectors fight back. *Immunology* 126:466-474.
- Walsh, P.T., J.L. Buckler, J. Zhang, A.E. Gelman, N.M. Dalton, D.K. Taylor, S.J. Bensinger, W.W. Hancock, and L.A. Turka. 2006. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs. *The Journal of clinical investigation* 116:2521-2531.
- Walunas, T.L., and J.A. Bluestone. 1998. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol* 160:3855-3860.
- Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2007. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 445:766-770.
- Wang, B., Y.B. Geng, and C.R. Wang. 2001. CD1-restricted NK T cells protect nonobese diabetic mice from developing diabetes. *The Journal of experimental medicine* 194:313-320.
- Wang, H., Y. Jin, M.V. Reddy, R. Podolsky, S. Liu, P. Yang, B. Bode, J.C. Reed, R.D. Steed, S.W. Anderson, L. Steed, D. Hopkins, Y. Huang, and J.X. She. 2010a. Genetically dependent ERBB3 expression modulates antigen presenting cell function and type 1 diabetes risk. *PloS one* 5:e11789.
- Wang, J., S. Tsai, A. Shameli, J. Yamanouchi, G. Alkemade, and P. Santamaria. 2010b. In situ recognition of autoantigen as an essential gatekeeper in autoimmune CD8+ T cell inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:9317-9322.
- Wang, L., K. Pino-Lagos, V.C. de Vries, I. Guleria, M.H. Sayegh, and R.J. Noelle. 2008a. Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:9331-9336.
- Wang, R., Q. Wan, L. Kozhaya, H. Fujii, and D. Unutmaz. 2008b. Identification of a regulatory T cell specific cell surface molecule that mediates suppressive signals and induces Foxp3 expression. *PloS one* 3:e2705.
- Wang, S.H., G.H. Chen, Y. Fan, M. Van Antwerp, and J.R. Baker, Jr. 2009. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits experimental autoimmune thyroiditis by the expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Endocrinology* 150:2000-2007.
- Wang, X., M. Rickert, and K.C. Garcia. 2005. Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its alpha, beta, and gamma receptors. *Science* 310:1159-1163.
- Wang, Y., J. Liu, C. Liu, A. Naji, and D.A. Stoffers. 2013. MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic beta-cells. *Diabetes* 62:887-895.
- Watts, T.H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annual review of immunology* 23:23-68.
- Webster, K.E., S. Walters, R.E. Kohler, T. Mrkvan, O. Boyman, C.D. Surh, S.T. Grey, and J. Sprent. 2009. In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *The Journal of experimental medicine* 206:751-760.

- Wei, S., I. Kryczek, and W. Zou. 2006. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood* 108:426-431.
- Weiss, J.M., A.M. Bilate, M. Gobert, Y. Ding, M.A. Curotto de Lafaille, C.N. Parkhurst, H. Xiong, J. Dolpady, A.B. Frey, M.G. Ruocco, Y. Yang, S. Floess, J. Huehn, S. Oh, M.O. Li, R.E. Niec, A.Y. Rudensky, M.L. Dustin, D.R. Littman, and J.J. Lafaille. 2012. Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *The Journal of experimental medicine* 209:1723-1742, S1721.
- Wen, L., F.S. Wong, L. Burkly, M. Altieri, C. Mamalaki, D. Kioussis, R.A. Flavell, and R.S. Sherwin. 1998. Induction of insulinitis by glutamic acid decarboxylase peptide-specific and HLA-DQ8-restricted CD4(+) T cells from human DQ transgenic mice. *The Journal of clinical investigation* 102:947-957.
- Wen, L., F.S. Wong, J. Tang, N.Y. Chen, M. Altieri, C. David, R. Flavell, and R. Sherwin. 2000. In vivo evidence for the contribution of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DQ molecules to the development of diabetes. *The Journal of experimental medicine* 191:97-104.
- Wherrett, D.K., B. Bundy, D.J. Becker, L.A. DiMeglio, S.E. Gitelman, R. Goland, P.A. Gottlieb, C.J. Greenbaum, K.C. Herold, J.B. Marks, R. Monzavi, A. Moran, T. Orban, J.P. Palmer, P. Raskin, H. Rodriguez, D. Schatz, D.M. Wilson, J.P. Krischer, and J.S. Skyler. 2011. Antigen-based therapy with glutamic acid decarboxylase (GAD) vaccine in patients with recent-onset type 1 diabetes: a randomised double-blind trial. *Lancet* 378:319-327.
- Wildin, R.S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M.E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature genetics* 27:18-20.
- Williams, L.M., and A.Y. Rudensky. 2007. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nature immunology* 8:277-284.
- Winer, S., Y. Chan, G. Paltser, D. Truong, H. Tsui, J. Bahrami, R. Dorfman, Y. Wang, J. Zielenski, F. Mastronardi, Y. Maezawa, D.J. Drucker, E. Engleman, D. Winer, and H.M. Dosch. 2009. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nature medicine* 15:921-929.
- Wing, K., Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2008. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322:271-275.
- Wing, K., and S. Sakaguchi. 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature immunology* 11:7-13.
- Winkler, C., C. Lauber, K. Adler, H. Grallert, T. Illig, A.G. Ziegler, and E. Bonifacio. 2011. An interferon-induced helicase (IFIH1) gene polymorphism associates with different rates of progression from autoimmunity to type 1 diabetes. *Diabetes* 60:685-690.
- Wong, F.S., L. Wen, M. Tang, M. Ramanathan, I. Visintin, J. Daugherty, L.G. Hannum, C.A. Janeway, Jr., and M.J. Shlomchik. 2004. Investigation of the role of B-cells in type 1 diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 53:2581-2587.
- Workman, C.J., A.L. Szymczak-Workman, L.W. Collison, M.R. Pillai, and D.A. Vignali. 2009. The development and function of regulatory T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66:2603-2622.
- Wu, A.J., H. Hua, S.H. Munson, and H.O. McDevitt. 2002. Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:12287-12292.
- Wu, J., A. Katrekar, L.A. Honigberg, A.M. Smith, M.T. Conn, J. Tang, D. Jeffery, K. Mortara, J. Sampang, S.R. Williams, J. Buggy, and J.M. Clark. 2006. Identification of substrates of human protein-tyrosine phosphatase PTPN22. *The Journal of biological chemistry* 281:11002-11010.

- Xiao, X., W. Gong, G. Demirci, W. Liu, S. Spoerl, X. Chu, D.K. Bishop, L.A. Turka, and X.C. Li. 2012. New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo. *J Immunol* 188:892-901.
- Xu, D., M.L. Alegre, S.S. Varga, A.L. Rothermel, A.M. Collins, V.L. Pulito, L.S. Hanna, K.P. Dolan, P.W. Parren, J.A. Bluestone, L.K. Jolliffe, and R.A. Zivin. 2000. In vitro characterization of five humanized OKT3 effector function variant antibodies. *Cellular immunology* 200:16-26.
- Xu, L., A. Kitani, I. Fuss, and W. Strober. 2007. Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25- Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* 178:6725-6729.
- Xu, X., J. D'Hoker, G. Stange, S. Bonne, N. De Leu, X. Xiao, M. Van de Castele, G. Mellitzer, Z. Ling, D. Pipeleers, L. Bouwens, R. Scharfmann, G. Gradwohl, and H. Heimberg. 2008. Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas. *Cell* 132:197-207.
- Yadav, M., C. Louvet, D. Davini, J.M. Gardner, M. Martinez-Llordella, S. Bailey-Bucktrout, B.A. Anthony, F.M. Sverdrup, R. Head, D.J. Kuster, P. Ruminiski, D. Weiss, D. Von Schack, and J.A. Bluestone. 2012. Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *The Journal of experimental medicine* 209:1713-1722, S1711-1719.
- Yamaguchi, T., J.B. Wing, and S. Sakaguchi. 2011. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in immunology* 23:424-430.
- Yamazaki, S., A.J. Bonito, R. Spisek, M. Dhodapkar, K. Inaba, and R.M. Steinman. 2007. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood* 110:4293-4302.
- Yamazaki, S., D. Dudziak, G.F. Heidkamp, C. Fiorese, A.J. Bonito, K. Inaba, M.C. Nussenzweig, and R.M. Steinman. 2008. CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 181:6923-6933.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R.M. Steinman. 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* 198:235-247.
- Yanaba, K., J.D. Bouaziz, K.M. Haas, J.C. Poe, M. Fujimoto, and T.F. Tedder. 2008. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28:639-650.
- Yang, X.D., R. Tisch, S.M. Singer, Z.A. Cao, R.S. Liblau, R.D. Schreiber, and H.O. McDevitt. 1994. Effect of tumor necrosis factor alpha on insulin-dependent diabetes mellitus in NOD mice. I. The early development of autoimmunity and the diabetogenic process. *The Journal of experimental medicine* 180:995-1004.
- Yao, Z., Y. Kanno, M. Kerenyi, G. Stephens, L. Durant, W.T. Watford, A. Laurence, G.W. Robinson, E.M. Shevach, R. Moriggl, L. Hennighausen, C. Wu, and J.J. O'Shea. 2007. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 109:4368-4375.
- Yates, J., F. Roivis, P. Mitchell, B. Afzali, J. Tsang, M. Garin, R.I. Lechler, G. Lombardi, and O.A. Garden. 2007. The maintenance of human CD4+ CD25+ regulatory T cell function: IL-2, IL-4, IL-7 and IL-15 preserve optimal suppressive potency in vitro. *International immunology* 19:785-799.
- Yin, B., G. Ma, C.Y. Yen, Z. Zhou, G.X. Wang, C.M. Divino, S. Casares, S.H. Chen, W.C. Yang, and P.Y. Pan. 2010. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J Immunol* 185:5828-5834.
- Yip, L., T. Woehrle, R. Corriden, M. Hirsh, Y. Chen, Y. Inoue, V. Ferrari, P.A. Insel, and W.G. Junger. 2009. Autocrine regulation of T-cell activation by ATP release and P2X7 receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:1685-1693.

- Yoshinaga, S.K., J.S. Whoriskey, S.D. Khare, U. Sarmiento, J. Guo, T. Horan, G. Shih, M. Zhang, M.A. Coccia, T. Kohno, A. Tafuri-Bladt, D. Brankow, P. Campbell, D. Chang, L. Chiu, T. Dai, G. Duncan, G.S. Elliott, A. Hui, S.M. McCabe, S. Scully, A. Shahinian, C.L. Shaklee, G. Van, T.W. Mak, and G. Senaldi. 1999. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402:827-832.
- Yoshizaki, A., T. Miyagaki, D.J. DiLillo, T. Matsushita, M. Horikawa, E.I. Kountikov, R. Spolski, J.C. Poe, W.J. Leonard, and T.F. Tedder. 2012. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 491:264-268.
- You, S., M. Belghith, S. Cobbold, M.A. Alyanakian, C. Gouarin, S. Barriot, C. Garcia, H. Waldmann, J.F. Bach, and L. Chatenoud. 2005. Autoimmune diabetes onset results from qualitative rather than quantitative age-dependent changes in pathogenic T-cells. *Diabetes* 54:1415-1422.
- You, S., B. Leforban, C. Garcia, J.F. Bach, J.A. Bluestone, and L. Chatenoud. 2007. Adaptive TGF-beta-dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:6335-6340.
- You, S., L. Poulton, S. Cobbold, C.P. Liu, M. Rosenzweig, D. Ringler, W.H. Lee, B. Segovia, J.F. Bach, H. Waldmann, and L. Chatenoud. 2009. Key role of the GITR/GITRLigand pathway in the development of murine autoimmune diabetes: a potential therapeutic target. *PloS one* 4:e7848.
- Youn, J.I., S. Nagaraj, M. Collazo, and D.I. Gabrilovich. 2008. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* 181:5791-5802.
- Yu, P., R.K. Gregg, J.J. Bell, J.S. Ellis, R. Divekar, H.H. Lee, R. Jain, H. Waldner, J.C. Hardaway, M. Collins, V.K. Kuchroo, and H. Zaghoulani. 2005. Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol* 174:6772-6780.
- Yuan, X., and T.R. Malek. 2012. Cellular and molecular determinants for the development of natural and induced regulatory T cells. *Human immunology* 73:773-782.
- Zaccone, P., O. Burton, N. Miller, F.M. Jones, D.W. Dunne, and A. Cooke. 2009. Schistosoma mansoni egg antigens induce Treg that participate in diabetes prevention in NOD mice. *European journal of immunology* 39:1098-1107.
- Zanin-Zhorov, A., Y. Ding, S. Kumari, M. Attur, K.L. Hippen, M. Brown, B.R. Blazar, S.B. Abramson, J.J. Lafaille, and M.L. Dustin. 2010. Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science* 328:372-376.
- Zarek, P.E., C.T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, and J.D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 111:251-259.
- Zehn, D., and M.J. Bevan. 2006. T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity* 25:261-270.
- Zeiser, R., D.B. Leveson-Gower, E.A. Zambricki, N. Kambham, A. Beilhack, J. Loh, J.Z. Hou, and R.S. Negrin. 2008. Differential impact of mammalian target of rapamycin inhibition on CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells compared with conventional CD4+ T cells. *Blood* 111:453-462.
- Zeiser, R., and R.S. Negrin. 2008. Interleukin-2 receptor downstream events in regulatory T cells: implications for the choice of immunosuppressive drug therapy. *Cell Cycle* 7:458-462.
- Zekzer, D., F.S. Wong, O. Ayalon, I. Millet, M. Altieri, S. Shintani, M. Solimena, and R.S. Sherwin. 1998. GAD-reactive CD4+ Th1 cells induce diabetes in NOD/SCID mice. *The Journal of clinical investigation* 101:68-73.
- Zeng, L., L. Wan, L. Chen, S. Li, Y. Lu, Q. Huang, L. Wang, Y. Li, J. Cheng, and X. Lu. 2006. Selective depletion of activated T cells by recombinant immunotoxin containing anti-CTLA-4 single-chain fragment of variable antibody and N-terminal fragment of perforin. *Transplantation proceedings* 38:2151-2153.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Zhang, N., B. Schroppel, G. Lal, C. Jakubzick, X. Mao, D. Chen, N. Yin, R. Jessberger, J.C. Ochando, Y. Ding, and J.S. Bromberg. 2009. Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* 30:458-469.
- Zhang, Q., F. Cui, L. Fang, J. Hong, B. Zheng, and J.Z. Zhang. 2013a. TNF-alpha impairs differentiation and function of TGF-beta-induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *Journal of molecular cell biology* 5:85-98.
- Zhang, R., A. Huynh, G. Whitcher, J. Chang, J.S. Maltzman, and L.A. Turka. 2013b. An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *The Journal of clinical investigation* 123:580-593.
- Zhang, W., J. Sloan-Lancaster, J. Kitchen, R.P. Tribble, and L.E. Samelson. 1998. LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* 92:83-92.
- Zhao, J., C. Fett, K. Trandem, E. Fleming, and S. Perlman. 2011. IFN-gamma- and IL-10-expressing virus epitope-specific Foxp3(+) T reg cells in the central nervous system during encephalomyelitis. *The Journal of experimental medicine* 208:1571-1577.
- Zheng, S.G., J.H. Wang, W. Stohl, K.S. Kim, J.D. Gray, and D.A. Horwitz. 2006. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol* 176:3321-3329.
- Zheng, Y., A. Chaudhry, A. Kas, P. deRoos, J.M. Kim, T.T. Chu, L. Corcoran, P. Treuting, U. Klein, and A.Y. Rudensky. 2009. Regulatory T-cell suppressor program co-opts transcription factor IRF4 to control T(H)2 responses. *Nature* 458:351-356.
- Zheng, Y., S. Josefowicz, A. Chaudhry, X.P. Peng, K. Forbush, and A.Y. Rudensky. 2010. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* 463:808-812.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martinez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature immunology* 10:1000-1007.
- Zhou, X., L.T. Jeker, B.T. Fife, S. Zhu, M.S. Anderson, M.T. McManus, and J.A. Bluestone. 2008. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 205:1983-1991.
- Zhu, B., Y. Bando, S. Xiao, K. Yang, A.C. Anderson, V.K. Kuchroo, and S.J. Khoury. 2007. CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:5228-5237.



Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs

Yenkel Grinberg-Bleyer,^{1,2,3} David Saadoun,^{1,2,3} Audrey Baeyens,^{1,2,3} Fabienne Billiard,^{1,2,3} Jérémie D. Goldstein,^{1,2,3} Sylvie Grégoire,^{1,2,3} Gaëlle H. Martin,^{1,2,3} Rima Elhage,^{1,2,3} Nicolas Derian,^{1,2,3} Wassila Carpentier,^{1,4} Gilles Marodon,^{1,2,3} David Klatzmann,^{1,2,3} Eliane Piaggio,^{1,2,3} and Benoît L. Salomon^{1,2,3}

¹Université Pierre et Marie Curie — Univ Paris 06, ²CNRS UMR 7211, ³INSERM U959, Paris, France.

⁴Plate-forme Post-Génomique P3S, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France.

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs play a major role in prevention of autoimmune diseases. The suppressive effect of Tregs on effector T cells (Teffs), the cells that can mediate autoimmunity, has been extensively studied. However, the *in vivo* impact of Teff activation on Tregs during autoimmunity has not been explored. In this study, we have shown that CD4⁺ Teff activation strongly boosts the expansion and suppressive activity of Tregs. This helper function of CD4⁺ T cells, which we believe to be novel, was observed in the pancreas and draining lymph nodes in mouse recipients of islet-specific Teffs and Tregs. Its physiological impact was assessed in autoimmune diabetes. When islet-specific Teffs were transferred alone, they induced diabetes. Paradoxically, when the same Teffs were cotransferred with islet-specific Tregs, they induced disease protection by boosting Treg expansion and suppressive function. RNA microarray analyses suggested that TNF family members were involved in the Teff-mediated Treg boost. *In vivo* experiments showed that this Treg boost was partially dependent on TNF but not on IL-2. This feedback regulatory loop between Teffs and Tregs may be critical to preventing or limiting the development of autoimmune diseases.

Introduction

The peripheral T cell repertoire of any individual contains autoreactive T cells specific for a variety of self antigens (1). Their activation could induce an autoimmune process, eventually leading to an autoimmune disease. Severe and prolonged inflammation in a tissue may lead to the activation of pathological autoreactive T cells by several mechanisms (2, 3). At the site of inflammation or in draining LNs, tissue damage results in an enhanced presentation of autoantigens by newly recruited mature antigen-presenting cells. Also, released cytokines, chemokines, and inflammatory factors may attract and induce bystander activation of autoreactive memory/effector T cells (Teffs), leading to initiation or exacerbation of a preexisting autoimmune process and eventually clinical disease.

These potentially pathologic processes are controlled by several factors and feedback mechanisms. For example, strongly activated Teffs can secrete the antiinflammatory IL-10 cytokine (4). Also, IFN- γ expression by Teffs may favor production of the antiinflammatory indoleamine 2,3-dioxygenase (5) or promote Tim-3/galectin-9 interaction regulating T helper type 1 immunity (6). But one of the major mechanisms controlling inflammation and autoreactive Teffs involves the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Tregs (7–12). Moreover, high numbers of Tregs are observed in inflamed tissues in various contexts (13–19). Different mechanisms may explain this increased Treg frequency. A Treg subset with an “activated/memory” phenotype preferentially migrates to inflamed tissues (20). Also, enhanced presentation of autoantigens by increased num-

bers of mature DCs in inflamed tissues may favor the activation of autoreactive Tregs (21–23), which would then turn on their suppressive activity and exert bystander suppression (24, 25).

Thus, during an autoimmune process, there is a local enrichment of both autoreactive Teffs and Tregs. Since the efficacy of Treg-mediated suppression depends on the equilibrium between activated Teffs and activated Tregs (26), any factor that could tip this balance to one side or the other could then determine the outcome of the autoimmune process. In this study, we have identified what we believe is a novel feedback mechanism, which may help maintain this equilibrium. We hypothesized that in order to maintain a Teff/Treg balance, in addition to the well-established suppressive activity of Tregs on Teffs, there could be a feedback mechanism allowing Teffs to boost Treg activity. We indeed found that antigen-specific activation of Teffs boosts Treg expansion and improves their suppressive function. Thus, diabetogenic Teffs paradoxically help islet-specific Tregs to provide sustained protection from diabetes.

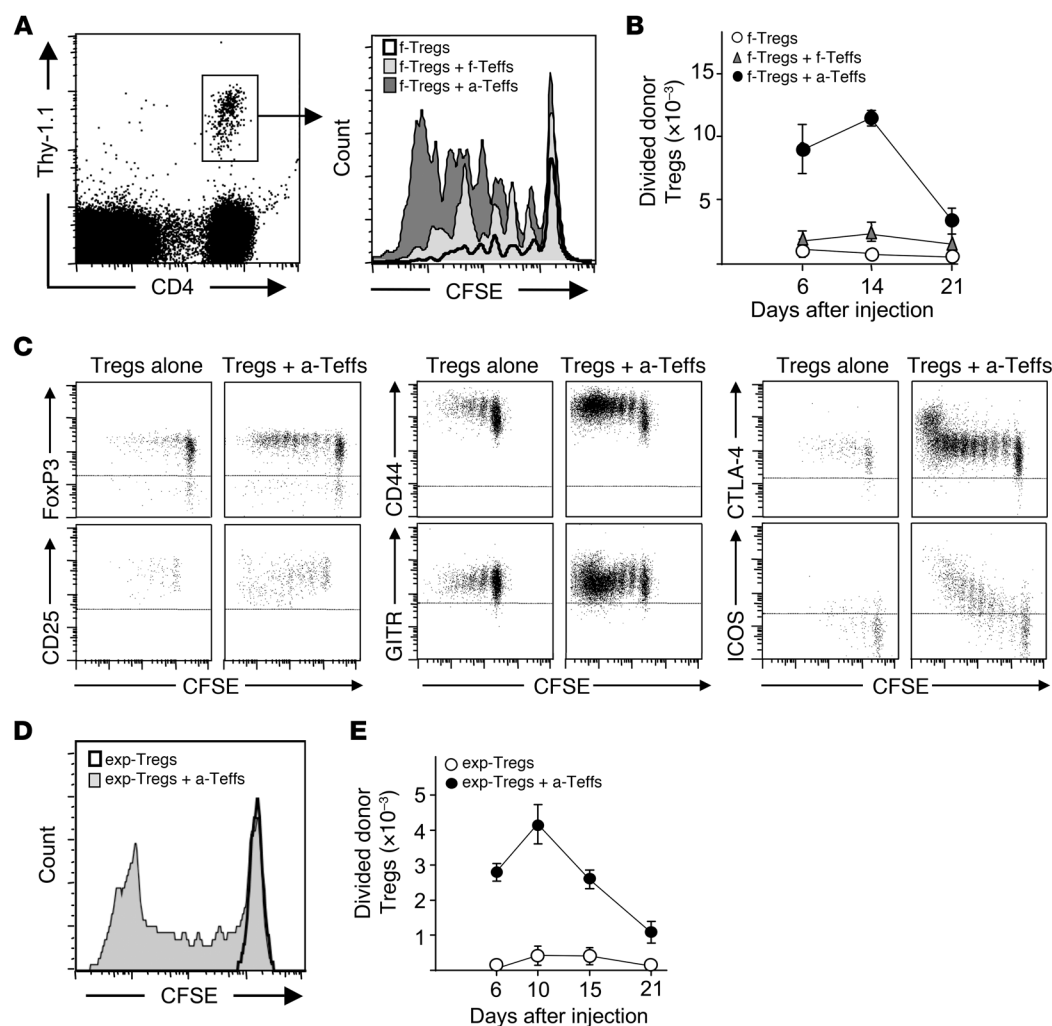
Results

Teffs boost Treg activation during an autoimmune response. Tregs proliferate *in vivo* when stimulated by their cognate antigen (21, 27–29). In this report, we addressed whether activated conventional CD4⁺ T cells would have an impact on the level of Treg activation *in vivo* in an autoimmune context. This was first studied in a model of adoptive transfer of influenza virus HA-specific (transgenic) Tregs and Teffs into ins-HA transgenic mice, which express HA under the control of the insulin promoter. We had previously observed that HA-specific Tregs (HA-Tregs) preferentially proliferated and expanded at days 5–7 after transfer in draining pancreatic LNs (PLNs) of ins-HA homozygous mice (29). When we repeated the experiment in ins-HA hemizygous recipients, which express lower

Authorship note: Yenkel Grinberg-Bleyer and David Saadoun contributed equally to this work. Eliane Piaggio and Benoît L. Salomon are co-senior authors.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest.* 2010;120(12):4558–4568. doi:10.1172/JCI42945.

**Figure 1**

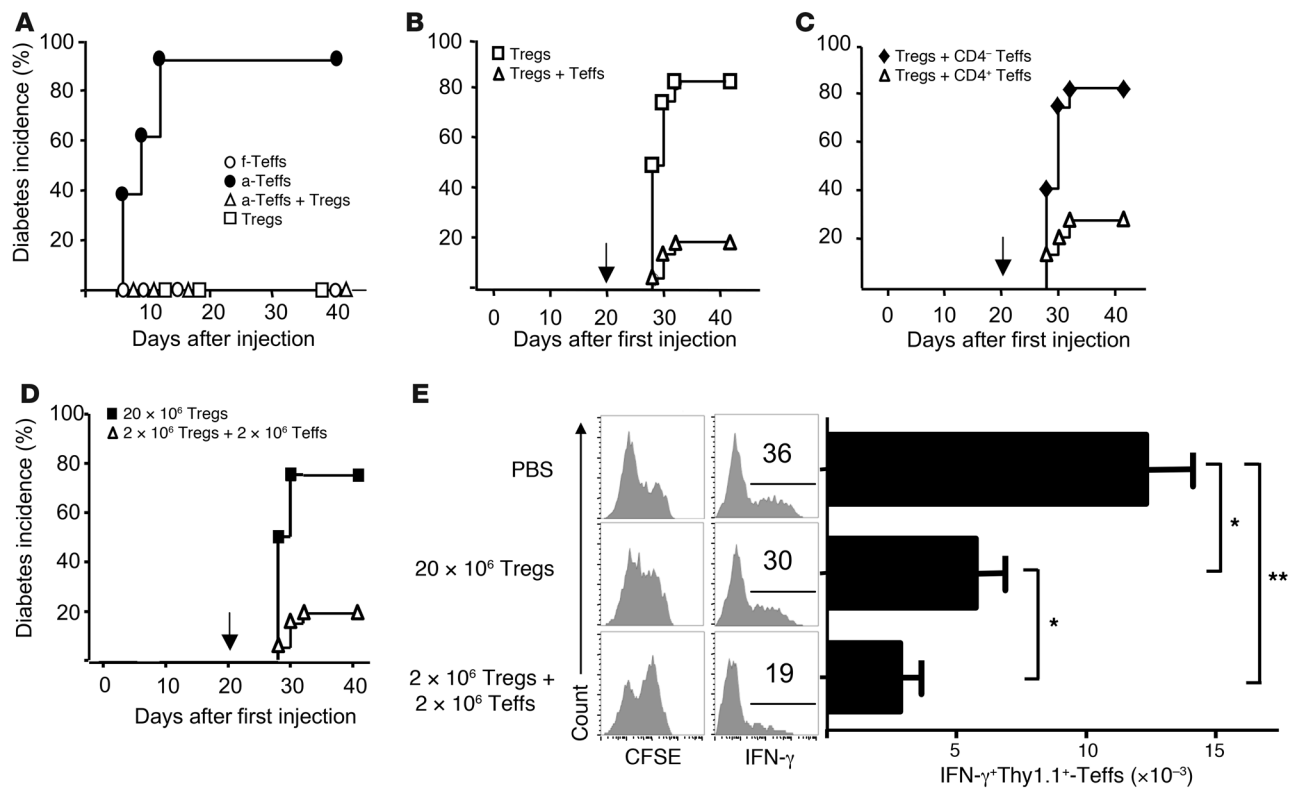
Islet-specific Teffs strongly boost the activation of islet-specific Tregs. (A–C) Ins-HA mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ freshly purified HA-Tregs alone (f-Tregs) or were cotransferred with freshly purified HA-Teffs (f-Tregs + a-Teffs) or preactivated HA-Teffs (f-Tregs + a-Teffs). (A) Representative CFSE profile of donor Tregs (gated on CD4⁺Thy-1.1⁺ cells as shown in the left panel) in PLNs 14 days after cell injection. (B) Absolute number of divided donor Tregs (CFSE^{dim}CD4⁺Thy-1.1⁺ cells) were quantified in PLNs at 6, 14, and 21 days after cell transfer. The graph shows mean data from 3 to 8 mice per time point pooled from 4 independent experiments. (C) Representative expression of the indicated proteins on donor Tregs in PLNs 7 days after cell injection. Plots, gated on CD4⁺Thy-1.1⁺ cells (for FoxP3) or CD4⁺Thy-1.1⁺FoxP3⁺ cells (for the other markers), are representative of 2 to 5 independent experiments. Horizontal dashed lines delineate positive staining. (D and E) Ins-HA mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ expanded HA-Tregs alone (exp-Tregs) or were cotransferred with preactivated HA-Teffs (exp-Treg + a-Teffs). (D) Representative CFSE profile of donor Tregs in PLNs 10 days after cell injection. (E) Absolute numbers of divided donor Tregs (CFSE^{dim}CD4⁺Thy-1.1⁺ cells) were quantified in PLNs various days after cell injection. The graph shows mean data from 4 to 8 mice per time point collected from 4 independent experiments. Error bars represent SD.

levels of HA in β cells (30), HA-Tregs proliferated at a lower level and were detected in PLNs for 3 weeks (Figure 1). We then assessed whether coadministration of HA-Teffs had an effect on HA-Treg activation (Figure 1). The cotransfer of freshly purified HA-specific T cells induced a moderate but marked increase of proliferation and expansion of donor Tregs. Strikingly, the cotransfer of preactivated HA-specific T cells (HA-Teffs) induced a strong increase in proliferation of donor Tregs over the 3-week duration of the experiment, with a 6- to 17-fold increase in the absolute number of divided HA-Tregs at days 6 to 21 in PLNs (Figure 1, A and B). In this Teff-dependent Treg boost (Teff→Treg boost), divided HA-Tregs maintained high expression of FoxP3, glucocorticoid-

induced TNFR-related protein (GITR), and CTLA-4, decreased CD25 expression, and upregulated CD44 expression, consistent with an “effector-memory” Treg phenotype (20, 29, 31). Interestingly, the expression of inducible T cell costimulator (ICOS) molecule was strongly upregulated upon division during the Teff→Treg boost (Figure 1C). No Treg expansion was observed in nondraining LNs. Control preactivated Teffs specific for a non-self antigen that were not reactivated in PLNs after transfer in ins-HA mice did not boost activation of coinjected HA-Treg (data not shown). Thus, activated islet-specific Teffs strongly boosted the expansion of islet-specific Tregs, which acquired an activated phenotype at the site of Ag presentation.



research article

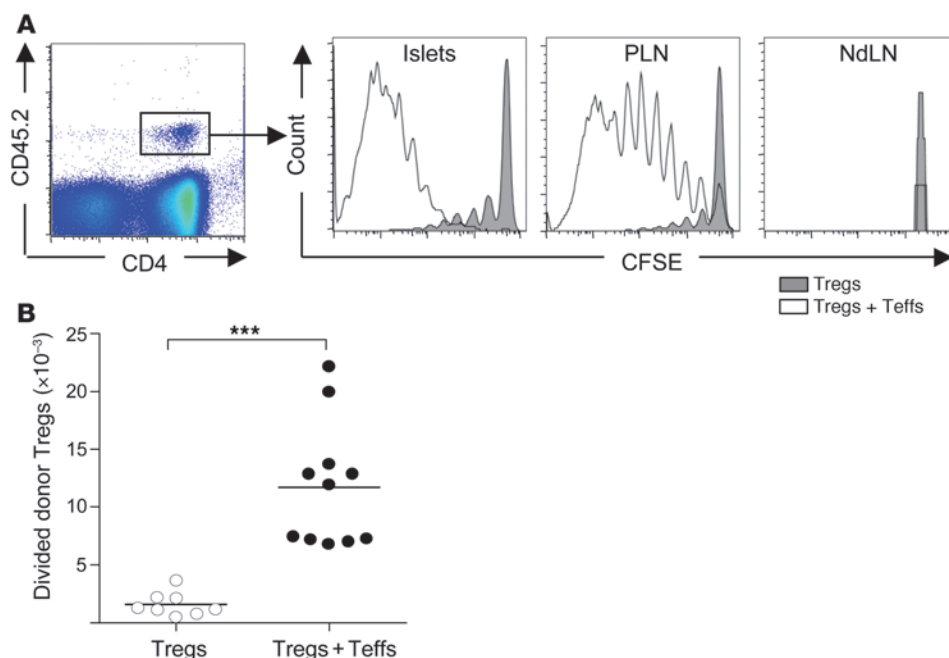
**Figure 2**

Paradoxical protective effect of diabetogenic T cells in autoimmune diabetes. (A) Diabetes incidence in ins-HA mice after transfer of freshly purified HA-Teffs (white circles, $n = 13$) or preactivated HA-Teffs (black circles, $n = 9$) or expanded HA-Tregs (white squares) or coinjection of preactivated HA-Teffs and expanded HA-Tregs (white triangles, $n = 9$). Data were from 4 experiments. (B) Ins-HA mice were transferred with expanded HA-Tregs alone (white squares, $n = 12$) or with preactivated HA-Teffs (white triangles, $n = 21$). 3 weeks later (arrow), mice were challenged for diabetes induction with preactivated HA-Teffs. Data were from 4 independent experiments. (C) Ins-HA mice were cotransferred with expanded HA-Tregs and the CD4⁺ (white triangles, $n = 14$) or CD4⁻ (black diamonds, $n = 12$) fractions of preactivated HA-Teffs. Mice were challenged 3 weeks later (arrow) with preactivated HA-Teffs. Data were from 2 independent experiments. (D and E) Ins-HA mice were transferred with 20×10^6 expanded HA-Tregs alone (black squares, $n = 4$) or coinjected with 2×10^6 expanded HA-Tregs and 2×10^6 preactivated HA-Teffs (white triangles, $n = 21$) or injected with PBS only (for E). Mice were challenged 3 weeks later with preactivated HA-Teffs to test their susceptibility to diabetes induction (D) or with CFSE-labeled Thy1.1⁺ preactivated HA-Teffs to analyze their activation 4 days later in PLNs (E). (E) CFSE profile and IFN- γ production of CD4⁺Thy1.1⁺FoxP3⁻ cells (left panels) and quantification of CD4⁺Thy1.1⁺FoxP3⁻IFN- γ ⁺ cell numbers (right panel). In A–D, Teffs and Tregs were obtained from Thy1.2 TCR-HA mice. Data were from 6 mice per group from 2 independent experiments. * $P < 0.05$; ** $P < 0.001$. Error bars represent SD.

To further study the Teff→Treg boost using pure Treg population, we generated a high number of pure Tregs by in vitro Ag-specific stimulation using previously described conditions (32). Tregs expanded by a factor of 1,000 over a 4-week period and maintained potent suppressive activity in vitro (Supplemental Figure 1, A and B; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI42945DS1). As with freshly purified Tregs, a strong Teff→Treg boost was observed in ins-HA mice cotransferred with expanded HA-Tregs and activated HA-Teffs in PLNs (Figure 1, D and E). Expanded Tregs maintained high Foxp3 expression and the activation markers mentioned above as well as the CD103 Treg activation marker (20) and CD127, when they were cotransferred with Teffs (Supplemental Figure 1C). Interestingly, high numbers of divided islet-specific donor Tregs were also observed in the pancreas of mice cotransferred with expanded HA-Treg and preactivated HA-Teff in ins-HA mice (Supplemental Figure 2). When injected alone, we could hardly detect any HA-Tregs in the pancreas, probably due to their incapacity to migrate to this

tissue in the absence of inflammation. These findings showed that HA-specific transgenic Teffs led to a higher level of proliferation and expansion in PLNs and pancreas of HA-specific transgenic Tregs after adoptive transfer in ins-HA mice.

Paradoxical protective effect of diabetogenic Teffs in diabetes due to increased Treg activity. To explore the effect of the Teff→Treg boost in the physiopathology of autoimmune diseases, we first set up a model of diabetes in ins-HA mice. The transfer of preactivated HA-Teffs in these mice, but not of freshly purified cells, triggered a rapid autoimmune diabetes with hyperglycemia within 6 to 12 days (Figure 2A). The diabetogenic capacity of HA-Teffs was probably due to their strong reactivation in PLNs, as suggested by increased proliferation and IL-2 and IFN- γ production compared with freshly purified CD4⁺ T cells (Supplemental Figure 3A). Ins-HA mice transferred with expanded HA-Tregs alone did not become diabetic. The cotransfer of expanded HA-Tregs prevented diabetes induced by activated HA-Teffs (Figure 2A). We then evaluated whether the Teff→Treg boost led to sustained dia-

**Figure 3**

Strong Teff→Treg boost in NOD mice. Four- to 7-week-old NOD mice were transferred with freshly purified CFSE-labeled CD45.2⁺ BDC2.5-Tregs alone or coinjected with preactivated BDC2.5-Teffs. **(A)** Representative CFSE profile of donor Tregs (CD4⁺CD45.2⁺ cells gated as shown in the left panel) in pancreatic islets (islets), PLNs, and nondraining LNs (NdLN) 5 days after transfer. **(B)** Absolute number of divided donor Tregs (CFSE^{dim}CD4⁺CD45.2⁺FoxP3⁺ cells) in PLNs at day 5. Dots represent individual mice, and bars show the means pooled from 3 independent experiments. ****P* < 0.0001.

betes protection by challenging the mice with activated HA-Teffs 3 weeks later. Most of the mice initially cotransferred with HA-Tregs and HA-Teffs did not develop diabetes after the challenge (Figure 2B). In contrast, mice initially transferred with HA-Tregs alone became diabetic 8 to 12 days after the challenge. Similar findings were obtained with freshly purified HA-Tregs (Supplemental Figure 3B). Since activated HA-Teffs, obtained after purification of CD25⁺ cells and *in vitro* stimulation, contained both CD4⁺ and CD4⁺ cells, we investigated which cell population was responsible for the sustained Treg-mediated regulation of diabetes. Only the CD4 fraction of the Teff population led to diabetes protection after challenge with the Teffs, presumably through increased expansion and activation of cotransferred Tregs (Figure 2C). Altogether, our results demonstrate that when Tregs were boosted by Teffs, mice were protected from diabetes induced by subsequent injection of activated Teff.

The protection from diabetes challenge conferred by the Teff→Treg boost could simply be explained by the increased number of donor Tregs compared with mice injected with Tregs alone. Additionally, the boost may also improve the intrinsic suppressive function of Tregs. Since mice that received HA-Tregs and activated HA-Teffs contained 10 times more donor Tregs in PLNs at the time of challenge (day 21) as mice that received HA-Tregs alone, we repeated the experiment by initial injection of either expanded HA-Tregs plus HA-Teffs or 10 times more Tregs alone. As expected, both groups of mice had similar numbers of HA-Tregs in PLNs at day 21 and even at a high number, HA-Tregs were not activated when transferred alone (Supplemental Figure 4). At this time, mice were challenged with activated HA-Teffs. Only mice that received HA-Tregs plus HA-Teffs were protected from the diabetes challenge (Figure 2D), suggesting that Teffs not only increased the proliferation/expansion of Tregs but also their suppressive activity. We confirmed this finding in an *in vivo* suppressive assay. Ins-HA mice were similarly injected with HA-Tregs plus HA-Teffs or 10 times more HA-Tregs alone or with PBS. Three weeks later, mice were challenged with activated HA-Teffs to

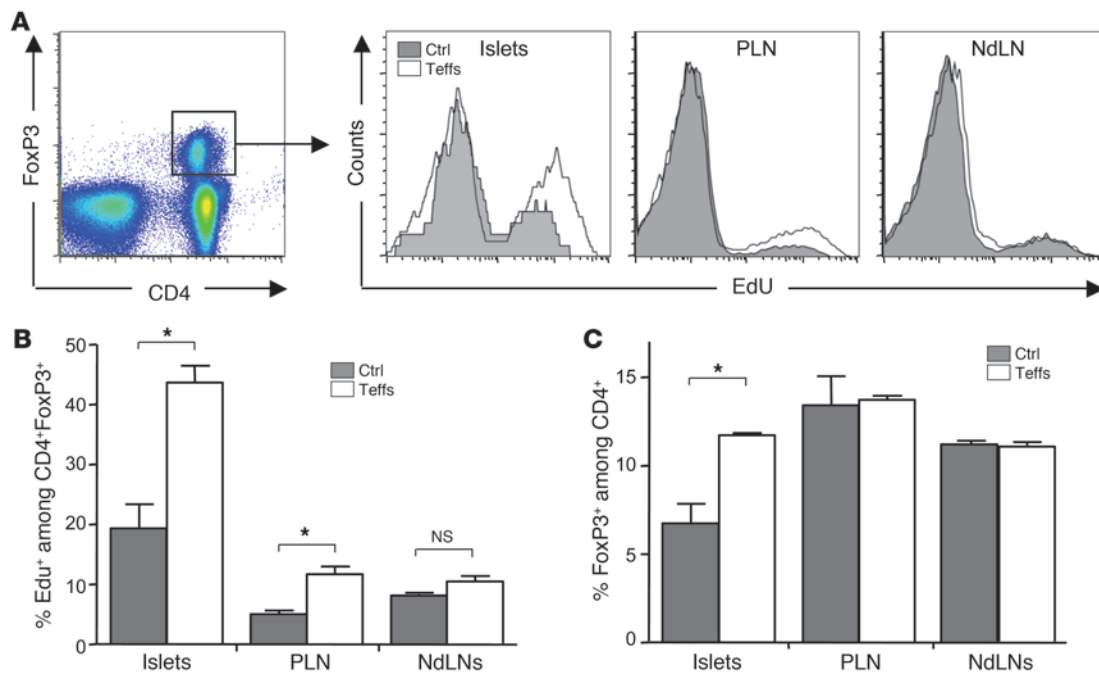
assess their activation in PLNs at day 4. In PBS control mice, HA-Teffs strongly proliferated and secreted high amounts of IFN- γ in PLNs (Figure 2E). This activation was significantly reduced in mice that received previously high amounts of HA-Tregs alone. Interestingly, HA-Teff activation was further suppressed in mice that were initially cotransferred with low amounts of HA-Tregs and HA-Teffs (Figure 2E). These experiments showed that the Teff→Treg boost not only increased the number and activation of Tregs but also enhanced their suppressive function.

Islet-specific Teffs boost islet-specific and polyclonal Tregs in NOD mice. We then explored whether the Teff→Treg boost phenomenon was also observed in the spontaneous and more physiological diabetes model of NOD mice. Similar adoptive transfer experiments were performed, using islet-specific Teffs and Tregs purified from the BDC2.5 TCR transgenic mice (33). Young NOD mice were injected with freshly purified Tregs from BDC2.5 mice (BDC-Tregs) alone or coinjected with preactivated T cells from BDC2.5 mice (BDC-Teffs). After 5 days, BDC-Tregs injected alone weakly divided and accumulated in PLNs. The cotransfer of BDC-Teffs induced a strong increase in the proliferation and expansion of BDC-Tregs (Figure 3, A and B), as observed in the ins-HA model (Figure 1). Interestingly, Teffs of the nontransgenic BDC2.5 clone, derived from diabetic NOD mice (34), were also able to boost BDC-Tregs in PLNs (data not shown). Since pancreatic islets of NOD mice are spontaneously inflamed after 3 weeks of age, favoring migration of activated islet-specific T cells in the pancreas, we evaluated the presence or not of a Teff→Treg boost in this tissue. As for PLNs, the cotransfer of preactivated BDC-Teffs dramatically increased the proliferation of BDC-Tregs in the pancreas (Figure 3A). No division was observed in the nondraining LNs because of the absence of islet-antigen presentation.

In order to go one step further in assessing the physiological relevance and extent of the Teff→Treg boost phenomenon, we analyzed whether it was also observed on polyclonal endogenous Tregs. We thus determined whether the administration of activated BDC-Teffs in NOD mice induced an increase in the proliferation



research article

**Figure 4**

Islet-specific Teffs boost polyclonal endogenous Tregs. Four- to 7-week-old NOD mice were injected with PBS (Ctrl) or transferred with preactivated CD45.2⁺ BDC-Teffs. Mice were administered with the nucleotide analog EdU at days 2 to 4 and sacrificed at day 4 to analyze proliferation of endogenous Tregs. Representative profile (A) and mean from 1 representative out of 4 independent experiments (B) of DNA incorporation of EdU among endogenous Tregs (CD4⁺FoxP3⁺CD45.2⁻) in pancreatic islets, PLN, and NdLNs. (C) Fold increase of the percentage of endogenous FoxP3⁺ cells among CD4⁺ cells between BDC-Teff-injected mice and PBS-injected mice. Mean data were obtained from 1 representative out of 4 independent experiments. **P* < 0.05. Error bars represent SD.

of endogenous Tregs. In control mice receiving PBS, we observed a low basal proliferation of endogenous Tregs in LNs and a higher one in pancreatic islets (Figure 4, A and B), as we had previously reported (29, 35). The administration of BDC-Teffs induced an increase in the proliferation of endogenous Tregs in the pancreas and PLNs but not in nondraining LNs (Figure 4, A and B). This led to an increase of the proportion of Tregs among CD4⁺ T cells only in the pancreas (Figure 4C). Altogether, these findings show that the Teff→Treg boost phenomenon is observed in different genetic backgrounds and with different T cell clones.

The Teff→Treg boost is not IL-2 dependent. We then started to explore the molecular mechanism involved in the Teff→Treg boost. IL-2 was an obvious candidate, since this cytokine is secreted shortly after T cell activation and is a potent Treg proliferation factor in vivo (36–39). We thus tested whether the Teff→Treg boost was mediated by IL-2 produced by Teffs using IL-2-deficient HA-Teffs from TCR-HA transgenic mice crossed to IL-2 KO mice. As shown in Figure 1, activation of transferred expanded HA-Tregs was strongly enhanced when IL-2-sufficient HA-Teffs were coinjected in ins-HA mice. Surprisingly, this strong Teff→Treg boost was still observed using IL-2-deficient HA-Teffs (Figure 5A). Similar findings were obtained with freshly purified HA-Tregs (Supplemental Figure 5). Thus, the Teff→Treg boost was not dependent on IL-2 produced by HA-Teffs. However, we could not rule out that IL-2-deficient activated Teffs would increase the levels of endogenous IL-2 produced by other cells, such as recipient Teffs or DCs. We thus analyzed by flow cytometry phosphorylation of STAT5 (p-STAT5) in Tregs, as a downstream marker of IL-2 signaling (39).

When analyzed at various time points for 4 days after cell transfer, only a small fraction of p-STAT5⁺ cells was detected within donor Tregs in mice that received Tregs alone. This proportion was not increased in mice that were cotransferred with Teffs (Figure 5B). As a control experiment, we checked that almost all Tregs became p-STAT5⁺ after administration of high-dose IL-2 3 hours before sacrifice at day 4 in mice receiving Teffs plus Tregs (Figure 5B). Furthermore, low- and high-dose IL-2 injected in control BALB/c mice resulted in enrichment of p-STAT5⁺ cells in Tregs that was detectable for at least 12 hours (Supplemental Figure 6). Thus, our results showed that no enrichment of p-STAT5 over basal levels was observed in Tregs at any time point during the Teff→Treg boost, suggesting that IL-2 was not involved. To further rule out a role of IL-2 in the Teff→Treg boost, we neutralized IL-2 with a mAb. The increased division of HA-Tregs induced by HA-Teffs was not reduced in the presence of increasing doses of anti-IL-2 mAb (Figure 5C). As expected (36), neutralizing IL-2 altered equally the survival of recipient and donor Tregs depending on the dose of anti-IL-2 mAb (Figure 5D). Altogether, these data showed that the increased Treg proliferation of boosted Tregs was not due to IL-2.

Tregs are boosted by Teffs in vitro and acquire a distinct RNA signature. To gain insight into the molecular mechanism of the Teff→Treg boost, we performed a microarray gene analysis to analyze the molecular pathway(s) modified in boosted Tregs. To gain access to enough cells for this kind of analysis, we first set up an in vitro model of the Teff→Treg boost that was not dependent on IL-2. HA-Tregs were cultivated for 5 days with HA-pulsed DCs alone or with freshly purified IL-2-sufficient or IL-2-deficient HA-Teffs in the

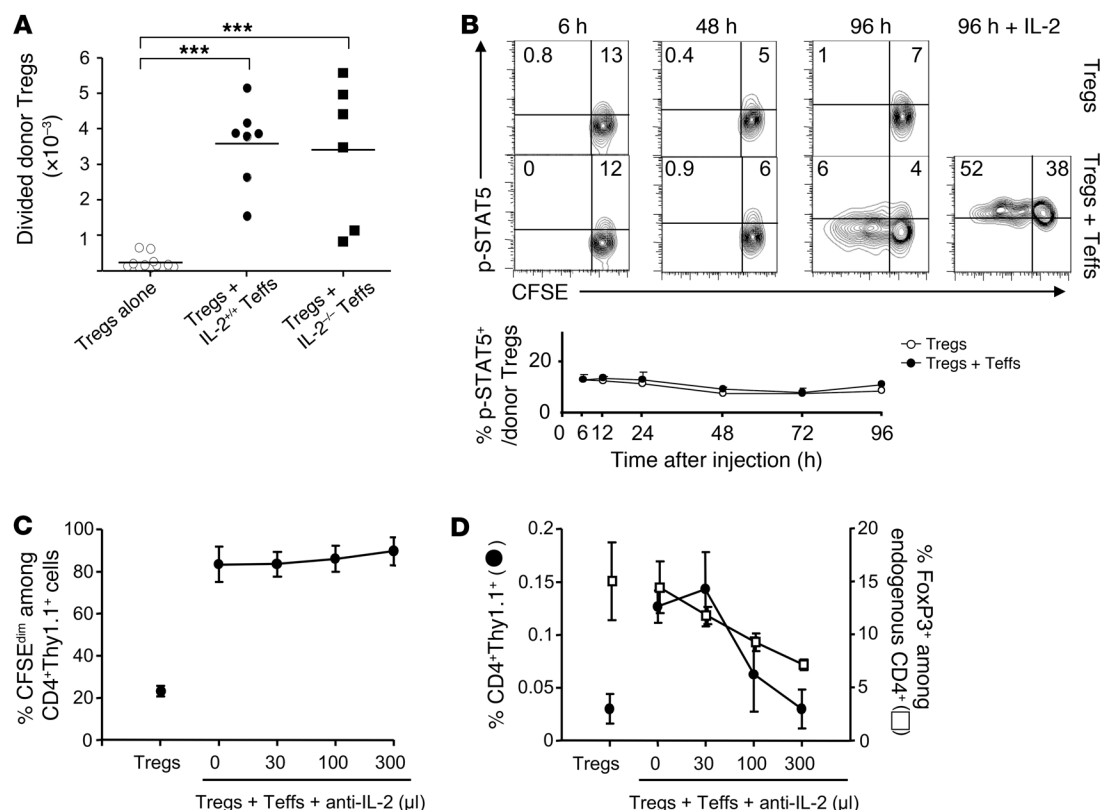


Figure 5

The Teff→Treg boost is not mediated by IL-2. **(A)** Ins-HA mice were transferred with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ expanded HA-Tregs alone or coinjected with preactivated HA-Teffs from IL-2-deficient or IL-2-sufficient littermate control mice. Divided HA-Treg numbers (CFSE^{dim}CD4⁺Thy-1.1⁺ cells) were quantified in PLNs 10 days later. Dots represent individual mice, and bars show the means from at least 2 independent experiments. *** $P < 0.0001$. **(B)** Ins-HA mice were transferred with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ expanded HA-Tregs alone or coinjected with IL-2-sufficient HA-Teffs. Phosphorylation of STAT5 on donor Tregs (CD4⁺Thy-1.1⁺FoxP3⁺) was determined at the indicated times in the PLN. Top panels show representative data from 2 independent experiments. Horizontal and vertical lines delineate positive p-STAT5 staining and undivided cells, respectively. At 96 hours, some mice were injected with 250,000 IU of human IL-2 3 hours before sacrifice as a positive control for phosphorylated STAT5 staining (right panel). The bottom graph represents the mean of 1 to 3 mice per time point from 2 independent experiments. **(C and D)** Ins-HA mice were transferred with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ expanded HA-Tregs alone or coinjected with preactivated HA-Teffs. Various doses of anti-IL-2 mAb (S4B6 mAb, expressed in μ l of ascites) were administered to block IL-2 after cell transfer. 10 days later, percentage of divided cells among donor Tregs **(C)** as well as percentages of whole donor Tregs (black circles) and endogenous Tregs (white squares) **(D)** were quantified in PLNs. Representative data of 2 independent experiments with 2 or 3 mice per group. Error bars represent SD.

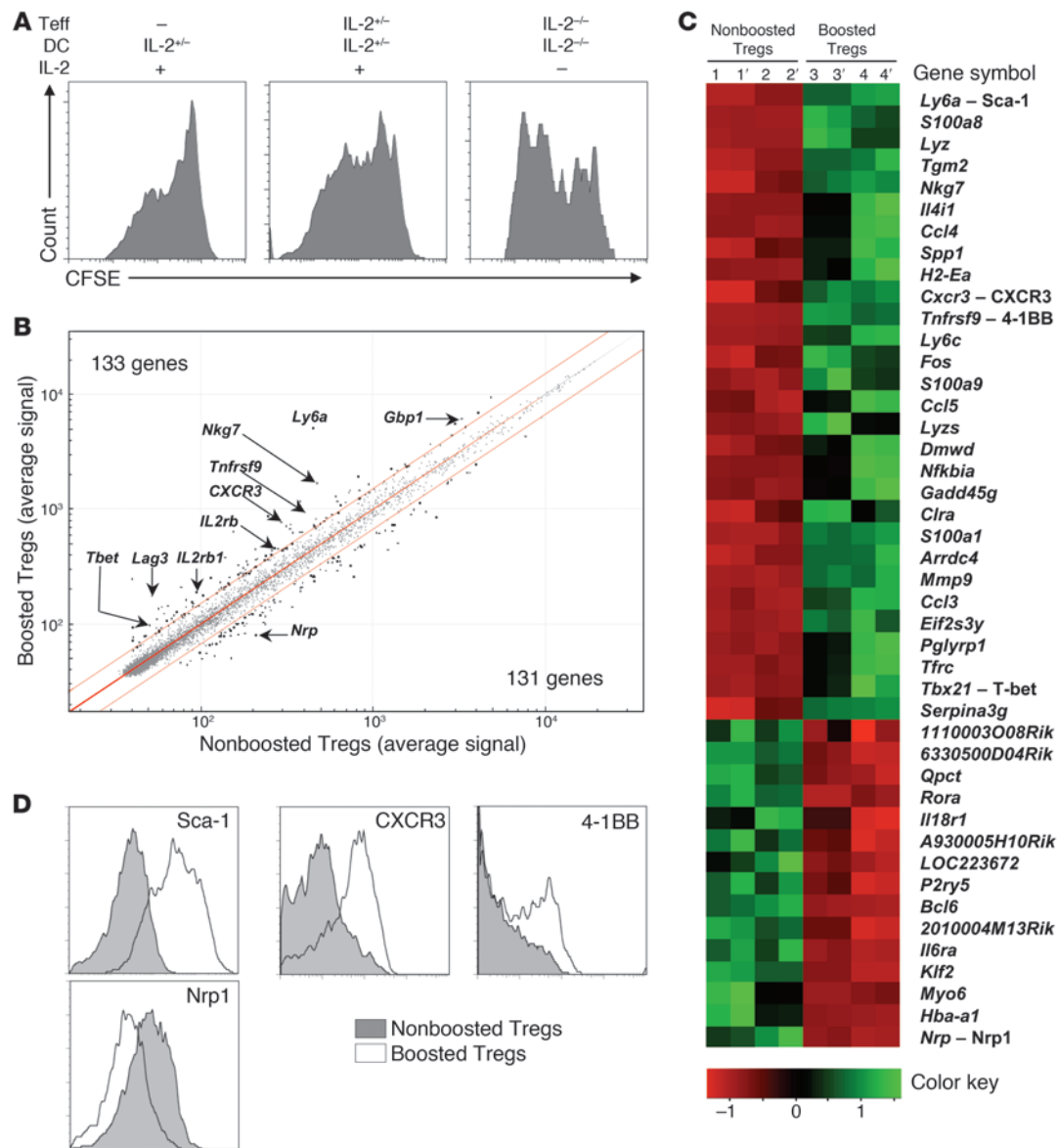
presence or not of exogenous IL-2. As expected, Tregs stimulated by DCs in the presence of IL-2 proliferated in vitro (Figure 6A). Importantly, this proliferation was increased when IL-2-sufficient HA-Teffs were added to the culture. Surprisingly, proliferation of Tregs cultivated with IL-2-deficient Teffs and DCs in the absence of exogenous IL-2 was even more important (Figure 6A), despite an expected loss of Treg survival (36) (data not shown). This data showed the existence of an IL-2-independent Teff→Treg boost in vitro, allowing us to use this model to compare the transcriptome of nonboosted and boosted Tregs. HA-Tregs were cultured with or without HA-Teffs for 5 days in the presence of exogenous IL-2 to maintain their survival and then sorted using a congenic marker to analyze their transcriptome by gene array. Boosted Tregs exhibited a specific RNA signature. Using a 1.5-differential fold-change expression cut-off, 133 genes were upregulated and 121 were downregulated in boosted Tregs compared with nonboosted Tregs. Among the upregulated genes, several belong to the so-called “Treg signature” (40), such as *Ly6a*, *Nkg7*, *Lag3*, *Tnfrsf9*

(4-1BB), *Gbp1*, *IL2rb*, and *Pdcd1lg1* (PD-L1) (Figure 6B). The list of genes with a 2-differential fold-change expression cut-off is shown in heat-map data (Figure 6C). We confirmed by flow cytometry that boosted Tregs upregulated Ly-6A (Sca-1), CXCR3, and 4-1BB and downregulated neuropilin-1 (Nrp1) (Figure 6D). The modulation of Sca-1 and Nrp1 expression in boosted Tregs was also confirmed in vivo (Supplemental Figure 7).

To have a more synthetic view of the molecular pathways modified in boosted Tregs, the data were processed through the Ingenuity pathway analysis software. Interestingly, the expression of the molecules of the alternative NF- κ B pathway (NIK/IKK α /p52/RelB) was upregulated in boosted Tregs (Supplemental Figure 8). This suggested that member(s) of the TNFR super-family that signal through this pathway, such as lymphotoxin- β R or TNF receptor 2 (TNFR2) (41), could be involved in the Teff→Treg boost. TNF became a potential candidate because (a) this cytokine is produced by activated Teffs, (b) its interaction with TNFR2 expressed by activated Tregs promote their expansion (42), and (c) boosted Tregs expressed TNFR2 (data



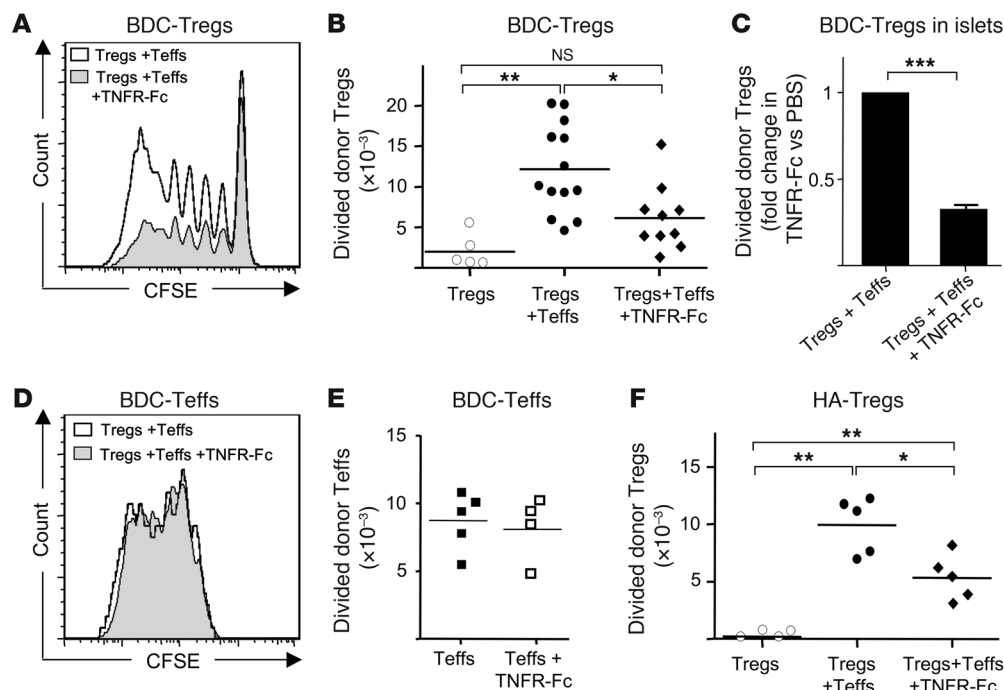
research article

**Figure 6**

Tregs boosted in vitro by Teffs change their phenotype. **(A)** Expanded CFSE-labeled Thy-1.1⁺ HA-Tregs were cultured for 5 supplemental days with IL-2-sufficient or –deficient HA-pulsed DCs alone or with freshly-purified IL-2-sufficient or –deficient HA-Teffs, in the presence or not of IL-2. Representative CFSE profile of CD4⁺Thy-1.1⁺ Tregs out of 3 independent experiments. **(B and C)** Comparison of the transcriptome of expanded HA-Tregs after 5 days of culture with IL-2, HA-pulsed DCs in the presence (boosted Tregs) or absence (nonboosted Tregs) of IL-2-sufficient Teffs. **(B)** Scatter plot comparison of average expression values in boosted Treg versus nonboosted Treg for all the 45,282 probes. Threshold lines were drawn at 1.5-fold-change expression ($P \leq 0.05$), and significant probes were depicted as bold spots. Genes of interest are indicated by their symbol names. **(C)** Heat map of distinct expression profiles revealed by microarray analysis of the nonboosted (biological samples 1 and 2) and boosted Treg populations (samples 3 and 4). Apostrophes indicate technical replicates of each biological sample. The genes were selected based on a fold-change ≥ 2 ($P \leq 0.05$). A color code scale indicates fold-change variation. **(D)** Tregs were cultured for 5 days as in **B**. Expression of the indicated molecules was compared when Tregs were cultivated with or without HA-Teffs. Histograms are representative of 2 independent experiments.

not shown). We thus tested the role of TNF in the Teff→Treg boost in NOD mice. Strikingly, when we blocked TNF using a TNFR2-Fc soluble receptor antagonist (blocking both TNF- α and TNF- β , also known as lymphotoxin- α), the Teff→Treg boost was significantly reduced, although not fully abolished in PLNs (Figure 7, A and B) and the pancreas (Figure 7C). Administration of a blocking mAb that neutralized only TNF- α similarly diminished the Treg boost

(Supplemental Figure 9). An important control was to check that the reduced Teff→Treg boost observed when TNF was neutralized was not due to a decreased Teff activation. This was not the case, since proliferation and expansion of Teffs were not reduced when blocking TNF (Figure 7, D and E). Similar findings were obtained in ins-HA mice (Figure 7F). These findings showed that part of the Teff→Treg boost was mediated by TNF- α .

**Figure 7**

The Teff→Treg boost is TNF dependent. (A–C) Four- to 6-week-old NOD mice were transferred with freshly isolated CFSE-labeled CD45.2⁺ BDC2.5-Tregs alone or coinjected with preactivated CD45.1⁺ BDC2.5-Teffs with or without TNFR2-Fc treatment. Representative CFSE profile (A) and absolute number of divided donor Tregs (CFSE^{dim}CD4⁺CD45.2⁺FoxP3⁺ cells) in PLN 5 days after transfer (B) from 6 independent experiments. Each symbol represents an individual mouse and bars show the means. (C) Relative accumulation of divided donor Tregs in the pancreas of TNFR2-Fc-treated mice compared with PBS-treated mice 5 days after transfer. Data are from 5 independent experiments with 6 mice per group. (D and E) Representative CFSE profile (D) and absolute number (E) of donor Teffs (CD4⁺CD45.2⁺FoxP3⁻ cells) in PLN 5 days after cotransfer of CD45.2⁺ Teffs and CD45.1⁺ Tregs in mice treated with saline or TNFR-Fc. (F) Ins-HA mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ expanded HA-Tregs alone or with preactivated HA-Teffs with or without TNFR-Fc treatment. Absolute numbers of divided donor Tregs (CFSE^{dim}CD4⁺Thy-1.1⁺ cells) were quantified in PLN 7 days after transfer. Each symbol represents an individual mouse, and bars show the means pooled from 3 independent experiments. **P* < 0.05; ***P* < 0.001. Error bars represent SD.

Discussion

In this study, we show that activated Teffs boost the expansion and suppressive function of Tregs *in vivo* by a TNF-dependent mechanism. The Teff→Treg boost may be important to prevent or limit autoimmunity when a tissue or organ is inflamed. We observed that preactivated diabetogenic Teffs are more efficient than freshly purified nondiabetogenic Teffs in boosting Treg activity. Consequently, Treg-mediated suppression is strengthened when most needed, i.e., under the condition of strong activation of autoreactive Teffs and subsequent risk of autoimmunity. Linking Treg expansion to Teff activation would generate a feedback regulatory loop for dynamically tuning the size of Treg populations to their target Teffs locally. Our data also raise the intriguing conclusion that the very same cells that have the capacity to induce diabetes can also favor disease protection when cotransferred with islet-specific Tregs. In the ins-HA model, the cotransfer of Tregs prevented diabetes induced by Teffs. The protective function of Tregs may be enhanced by the Teff→Treg boost, since it was detectable as soon as day 4, before diabetes onset in mice injected with Teffs only. In mice that received islet-specific Teffs and Tregs, we believe that diabetes protection at 3 weeks from a new challenge with Teffs was due to the presence of an increased number of highly suppressive donor Tregs. However, we cannot formally exclude that disease protection was acquired because of the establishment of a

local tolerogenic environment or because transferred Teffs became themselves tolerogenic, even if they did not acquire FoxP3 expression (data not shown). Thus, in autoimmune diseases, Teffs should be considered as either pathogenic or protective, as a result of the 2-way interaction between Tregs and Teffs.

The balance between activated Teffs and activated Tregs is critical for maintaining a healthy immune status. Persistent activation of Teffs, uncontrolled by Tregs, would lead to chronic inflammation and possibly autoimmune diseases. Conversely, too strong Treg-mediated suppression could lead to poor anti-infectious and anti-tumor immune responses. In biology, stable homeostatic balance usually depends on feedback mechanisms. Our data show that Teff activation increases proliferation of Tregs and their suppressive function. This feedback mechanism would favor the maintenance of Teff/Treg equilibrium, as shown in a proposed model (Supplemental Figure 10). In an inflammatory state with strong and sustained Teff activation, Teffs promote factors favoring a Treg boost, leading to subsequent Treg expansion. This expansion strengthens Treg-mediated suppression acting on Teffs, possibly perpetuating a dynamic Teff/Treg equilibrium and a state of localized and stable chronic inflammation, as described in some infectious diseases (43). Alternatively, the strong inhibition of Teff activation by boosted Tregs may lead to a decrease of factors promoting the Teff→Treg boost, leading to weak Treg-mediated sup-



research article

pression, favoring a return to basal homeostatic Teff/Treg equilibrium. In a simplified view, Teff/Treg equilibrium may result from the fact that Tregs inhibit Teff activity whereas Teffs promote Treg activity, reminiscent of feedback mechanisms observed in homeostatic regulation of hormone secretion (e.g., hormones of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis glands). A defect of the Teff→Treg boost may be one factor, among others, that coalesces for the establishment of an autoimmune disease.

This theoretical dynamic interaction between Tregs and Teffs inferred from our data and schematized in Supplemental Figure 10 may explain the relapsing/remitting status of several autoimmune diseases. During EAE, an animal model of multiple sclerosis, Teffs first colonize the central nervous system, where they extensively proliferate during the acute phase of the disease. This is followed by a secondary active Treg proliferation and then disease remission, due to the presence of Tregs (17, 44, 45). One may envisage that the primary Teff activation promotes a Teff→Treg boost, favoring remission. Then, because of the low level of Teff activation during remission, the Teff→Treg boost is weakened, leading to lower Treg suppressive activity, opening a window for disease relapse when a new wave of Teffs colonizes the target tissue.

What are the factors involved in the Teff→Treg boost phenomenon? IL-2 was an obvious candidate. Previous studies showed that a low level of IL-2, presumably produced by CD25^{lo} Teffs, is critical for the survival and homeostasis of Tregs. This effect may serve to maintain a physiological and stable equilibrium between Teffs and Tregs at the steady state (36, 46, 47). During an immune response, IL-2 produced by activated Teffs has also been reported to increase Treg expansion (39). In the Teff→Treg boost described here, IL-2 was necessary to maintain Treg survival and was thus critical to preserving a high number of boosted Tregs, but was clearly not involved in the increased Treg proliferation mediated by Teffs. In this line, we recently observed that administration of low-dose IL-2 induced diabetes prevention in NOD mice. This effect was associated with an increased Treg proportion in the pancreas, not due to an increase of their division, but probably to a better survival (35, 48). Also, administration of low-dose IL-2 in ins-HA mice that received HA-Tregs alone did not increase their proliferation in PLN at day 8 (data not shown). Furthermore, an increased expression of CD127 was observed on boosted Tregs, suggesting that IL-7 may be also involved in Treg survival, as previously observed in another context (49). TNF- α was clearly involved, since blocking this cytokine significantly reduced the Teff→Treg boost without inhibiting Teff activation. Interestingly, after TNF- α blockade, the fewer divided Tregs still went through an equal amount of divisions. This suggests that this cytokine is involved either in the entry into cycling of Tregs or in the viability of dividing Tregs. Future experiments will be required to determine what cellular source or sources of TNF- α are critical for the boost. In this line, TNF- α production was detected on Teffs, Tregs, and antigen-presenting cells in mice receiving Teffs and Tregs (data not shown). Our data are compatible with a previous report showing that interaction of TNF- α with TNFR2, but not TNFR1, promoted expansion of Tregs *in vitro* (42). Blocking TNF- α did not fully inhibit the Teff→Treg boost, suggesting that other molecular pathways are involved.

Further study of the transcriptome data comparing boosted versus nonboosted Tregs may provide indications on other molecule or molecules involved in the Teff→Treg boost. The following canonical pathways were preferentially modified in boosted Tregs: energy and cell cycling metabolism, costimulation (CD28, CD40, CD27, and

4-1BB), cytokine (IL-6, IL-2, IL-12 and lymphotoxin- β R), chemokine (IL-8, CCR5, CXCR4 and CXCR3), glucocorticoid receptor, aryl hydrocarbon receptor, and NF- κ B (Supplemental Table 1), revealing a complex and multifactorial phenomenon associated with the Teff→Treg boost. 4-1BB or ICOS may play a role because of their increased expression in boosted Tregs and their described capacity to favor Treg proliferation (50, 51). IFN- γ may be also involved since boosted Tregs expressed increased level of CXCR3 and T-bet, both upregulated by IFN- γ signaling, and T-bet-positive Tregs have increased proliferative response (31). Overall, our phenotypic, functional, and transcriptome analyses indicate that boosted Tregs acquire new properties with major gene expression modifications, an activated phenotype, and increased suppressive capacity.

Our findings may help explain intriguing and unresolved observations on the role of TNF- α in certain autoimmune diseases. Contrary to expectation, because of the well-established proinflammatory property of this cytokine, mice deficient in TNF- α (KO or treated with neutralizing antibody) developed more severe lupus, EAE, and diabetes, whereas TNF- α administration has therapeutic effects in these diseases (52–54). Also, TNF- α neutralization in patients with multiple sclerosis exacerbated the disease (55). The immunoregulatory role of TNF- α may be explained by its capacity to boost Treg activity. Indeed, spontaneous disease remission observed in EAE, which follows high Treg expansion (44), is abolished either by depleting Tregs (45) or in TNF- α -deficient mice (52, 53). Furthermore, TNF- α seems to exert its regulatory role by signaling through TNFR2 rather than TNFR1 since EAE was exacerbated in TNFR2-KO mice and reduced in TNFR1-KO mice (56). Again, this is compatible with a role of TNF- α acting on Tregs, since the interaction of this cytokine with TNFR2, and not TNFR1, promotes Treg expansion (42). We thus propose that during EAE, activated pathogenic Teffs promote TNF- α production, which induces a Teff→Treg boost via TNF/TNFR2 interaction, leading to disease remission. Our work reveals a new feedback mechanism that may have an essential role in slowdown or reduce certain immunopathologies.

Molecules able to boost Treg activity are under extensive investigation for their therapeutic potential in immunopathologies. IL-2 is being investigated in the treatment of autoimmune diseases (57). For instance, we recently showed that administration of low-dose IL-2 induced diabetes remission in new-onset diabetic NOD mice, probably by increasing Treg survival and function in the pancreas (35, 48). The Teff→Treg boost described in this work may lead to identifying other therapeutic molecules, such as TNF- α . Combining molecules promoting survival (such as IL-2) and proliferation (such as TNF- α) of Tregs may have a therapeutic interest. Further studies are required to define their proper utilization.

Methods

Mice. Six- to 8-week-old BALB/cByJ (BALB/c) mice were obtained from Charles River Laboratories. Ins-HA transgenic mice expressing HA under the control of the insulin promoter were backcrossed more than 10 generations onto a BALB/c genetic background (29). The TCR-HA transgenic mice that express a transgenic TCR recognizing the HA₁₁₁ epitope presented by I-E^d (58) were backcrossed more than 10 generations onto a BALB/c genetic background. Some of these mice were bred with Thy-1.1 BALB/c congenic mice and with IL-2-KO BALB/c mice. BDC2.5-TCR transgenic mice (33) and NOD-CD45.2 congenic mice were backcrossed more than 10 generations onto a NOD genetic background. All of these mice were bred in our animal facility under specific pathogen-free conditions. Harald von Boehmer, Nicolas Glaichenhaus, and Kathryn Haskins provided TCR-HA transgenic



mice, WT15 LACK-specific TCR transgenic mice, and the BDC2.5 clone, respectively. Manipulations were performed according to European Economic Community guidelines and under approval of the Regional Ethics Committee in Animal Experiment N° 3 of Ile-de-France region.

Cell preparation and adoptive transfer. Cells were prepared as previously described (29). Briefly, LNs (brachial, axillary, cervical, and inguinal) and spleen were mechanically dissociated. Cells, incubated with biotin-labeled anti-CD25 mAb (7D4; BD Biosciences), were coated with anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec). The CD25⁺ cell fraction (Tregs) was obtained after 2 consecutive runs on magnetic cell separation LS columns (Miltenyi Biotec), reaching 85% purity of CD25⁺ cells. The CD25⁻ cells were harvested from the flow through. This fraction contained 30% CD4⁺ T cells and 0.5% residual CD25⁺ cells.

To obtain in vitro-expanded HA-Tregs, we started the culture with 99% pure CD62L^{hi}CD4⁺CD25^{hi} cells, purified by flow cytometry from the CD25⁺ cell fraction of TCR-HA mice. Then cells were stimulated every week with splenic DCs purified using anti-CD11c-coupled beads (Miltenyi Biotec) presenting the HA peptide for 3 to 4 weeks as previously described (32). To obtain preactivated Teffs, the CD25⁻ fractions from TCR-HA or TCR-BDC2.5 mice were stimulated in vitro for 3–4 days by HA peptide-pulsed (10 µg/ml; Neosystems) splenic DCs or by irradiated NOD splenocytes, pulsed with 2 µg/ml of the p31 peptide (BDC antigenic mimotope, amino acids sequence YVRPLVWRME; Neosystems) in the presence of 10 ng/ml of GM-CSF. Before intravenous injection, cells were labeled with 2.5 µM CFSE for 5 minutes in PBS at room temperature and were washed twice in PBS. When freshly purified Tregs were used, mice received 1×10^6 Tregs with or without 1×10^6 CD25⁻ cells. When expanded Tregs were used, mice received 2×10^6 Tregs with or without 2×10^6 CD25⁻ cells.

Antibodies and flow cytometry analysis. The following mAbs from BD Biosciences, e-Bioscience, and BioLegend were used: allophycocyanin-labeled (APC-labeled), PerCP-labeled or Alexa Fluor 700-labeled anti-CD4; PE- or PerCP-labeled anti-Thy-1.1; PE-labeled anti-CD45.2; APC-labeled anti-CD25; APC-labeled anti-ICOS; APC-labeled anti-GITR; APC-labeled CD44; PE-labeled anti-CTLA-4; biotinylated anti-TNFR2; PE-labeled anti-Sca-1; biotinylated anti-CXCR3; biotinylated anti-4-1BB; purified goat anti-mouse anti-Nrp-1 (R&D Systems) followed by swine and goat-PE (Caltag); and PE-labeled anti-IFN-γ and anti-IL-2. Biotinylated antibodies were revealed by PerCP or APC streptavidins. The unlabeled 6.5 Ab was revealed by a biotin-labeled anti-rat IgG2b (SouthernBiotech) followed by streptavidin-APC (BD Biosciences) staining. The PE- or Pacific blue-labeled anti-Foxp3 staining was performed using the eBioscience kit and protocol. 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation was measured by using the Click-iT EdU Flow Cytometry Assay Kit (Molecular Probes) after FoxP3 staining. For intracellular cytokine staining, cells were restimulated by HA-pulsed splenocytes for 6 hours (Supplemental Figure 3) or with PMA (Sigma-Aldrich) and ionomycin (Sigma-Aldrich) for 4 hours (Figure 2E) in the presence of Golgi-Plug (BD Biosciences). After cell surface staining, intracellular staining was performed using the CytoFix/CytoPerm kit and protocol (BD Biosciences). For phospho-STAT5 staining, LNs were dilacerated and immediately fixed in PBS with 1.5% formaldehyde for 10 minutes. After washing and 10 minutes permeabilization in MeOH previously chilled at 4°C, cells were washed twice and stained in PBS with 0.2% BSA and 0.09% NaN₃ medium containing a cocktail of anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-Thy1.1, anti-Foxp3, and anti-p-STAT5 mAbs. In control stainings using an inhibitory peptide that blocks specifically the binding of anti-p-STAT5 mAb to its target (a gift from R. Balderas; BD), we did not detect any p-STAT5⁺ cells among Tregs. Cells were acquired on a FACSCalibur or an LSR II (BD Biosciences) and analyzed with CellQuest (BD Biosciences) or FlowJo (Tree Star) software.

Proliferation monitoring by EdU incorporation. To assess endogenous cell division, NOD mice injected with PBS or 3 million activated CD25⁻ cells

received 4 i.p. injections every 12 hours of 1 mg of EdU (Molecular Probes), a nucleoside analog of thymidine that incorporates into dividing DNA, and were sacrificed 4 hours after the last EdU injection.

In vivo blockade of IL-2 and TNF. For IL-2 blockade, mice were administered with different volumes of the neutralizing anti-IL-2 mAb (S4B6) purified from ascites and injected at the same time as cell transfer. For TNF blockade, mice were administered with 1 mg of soluble TNFR2 (etanercept [Enbrel]; Wyeth) at days 0, 2, and 4 or with 0.5 mg of an anti-TNF-α mAb (XT3.11; BioXCell) at days 0, 2, and 4.

Diabetes induction. From 1 to 2×10^6 in vitro preactivated HA-Teffs, obtained as described above, were injected i.v. with or without equal numbers of Tregs into ins-HA transgenic mice. Blood glucose levels were monitored using a glucometer (OneTouch Basic, LifeScan Inc.) and were considered diabetic after 2 consecutive measurements over 250 mg/dl.

Sample generation and DNA microarray hybridization and analysis. Expanded HA-specific Thy-1.1 Tregs were cultured in the presence of murine IL-2 (10 ng/ml) with or without HA-specific Teffs. HA-pulsed DCs were put in 6-well plates with Tregs with or without Teffs in a ratio of 1 DC/5 Tregs/5 Teffs. After 5 days, CD4⁺Thy-1.1⁺ Tregs were sorted by flow cytometry. RNA was generated using RNeasy Mini kit (QIAGEN) and its quality was verified in an Agilent Bioanalyzer. Total RNA was amplified and converted to biotinylated cRNA according to the manufacturer's protocol (Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit; Ambion). Two biological duplicates were hybridized to the Sentrix BeadChips Array mouse WG-6 v2 (Illumina) and read at the Pitie-Salpetriere P3S platform, Paris, France. Data extraction and normalization were performed using Quantile normalization in the BeadStudio software. The list of genes differently expressed in the boosted Tregs was used for pathway analysis. GenBank accession numbers (ArrayExpress E-MTAB-146) were imported into and mapped to the Ingenuity database using Ingenuity pathway analysis software (<http://www.ingenuity.com>) to model relationships among genes and proteins and to construct putative pathways and relevant biological processes.

Statistics. Statistical data were calculated using the 2-tailed unpaired Student *t* test. *P* < 0.05 was considered significant. For all the graphs, error bars represent SD.

Acknowledgments

We are grateful to José Cohen, Dan-Avi Landau, Guillaume Darasse-Jéze, Jeffrey Bluestone, Yasmine Belkaid, and Lucienne Chatenoud for their constructive and critical reading of the manuscript. We thank Harald von Boehmer, Nicolas Glaichenhaus, and Kathryn Haskins for providing us with the TCR-HA transgenic mice, WT15 LACK-specific TCR transgenic mice, and the BDC2.5 clone, respectively. We thank Pierrick Parent, Christelle Enond, François Bodin, and Serban Morosan for taking good care of the mice. Y. Grinberg-Bleyer, A. Baeyens, F. Billiard, and J. Goldstein were supported by the Ministère de la Recherche and by the Fondation pour la Recherche Médicale, D. Saadoun by the Agence Nationale de la Recherche sur le SIDA. This work was supported by the Juvenile Diabetic Research Foundation (1-2005-1056) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-MIIM-003-01, ANR-09-GENO-006-01).

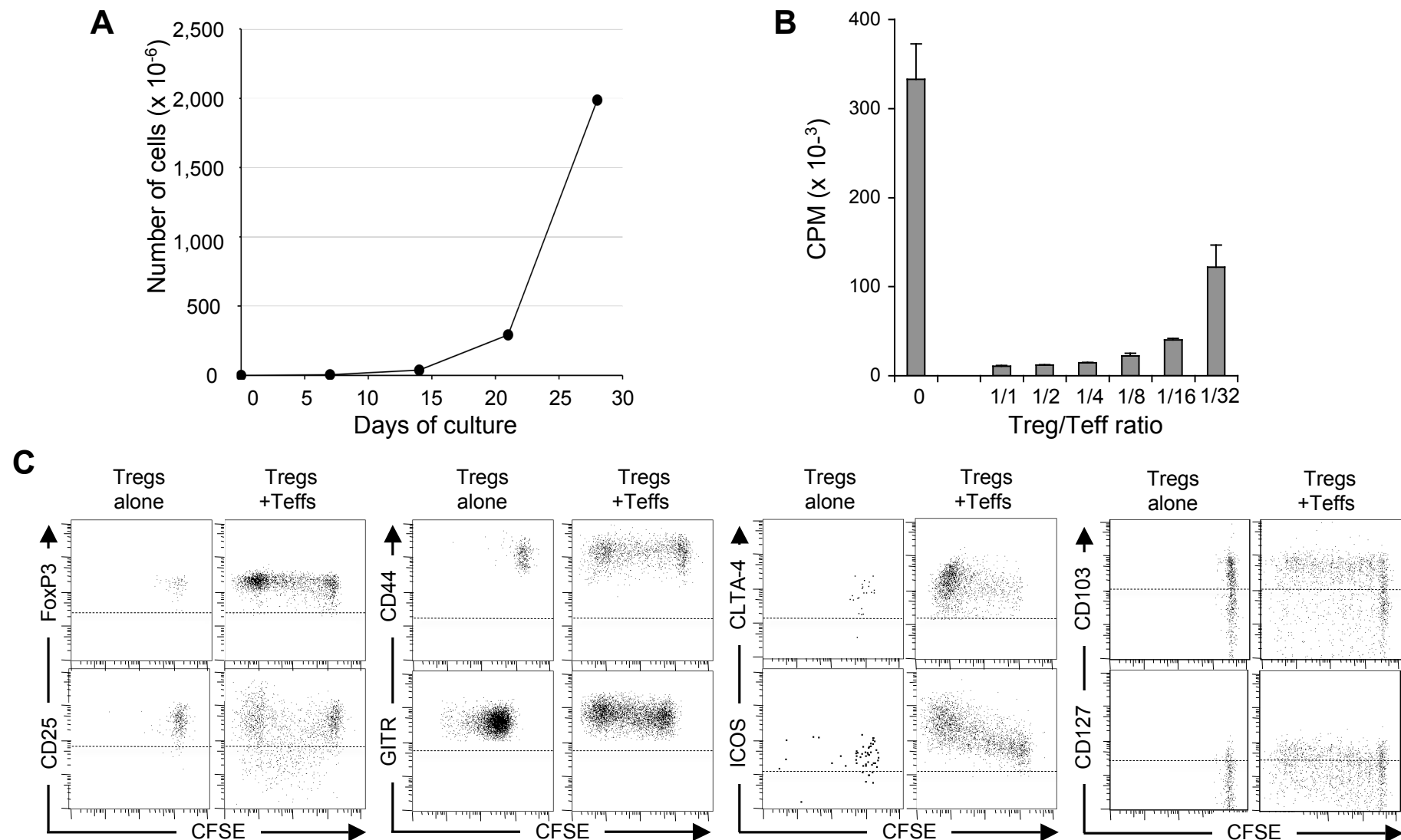
Received for publication March 11, 2010, and accepted in revised form September 15, 2010.

Address correspondence to: Benoît L. Salomon or Eliane Piaggio, UPMC CNRS UMR7211 INSERM U959, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 Bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Phone: 33.1.42.17.74.66; Fax: 33.1.42.17.74.41; E-mail: benoit.salomon@upmc.fr (B.L. Salomon); elianepiaggio@yahoo.com (E. Piaggio).

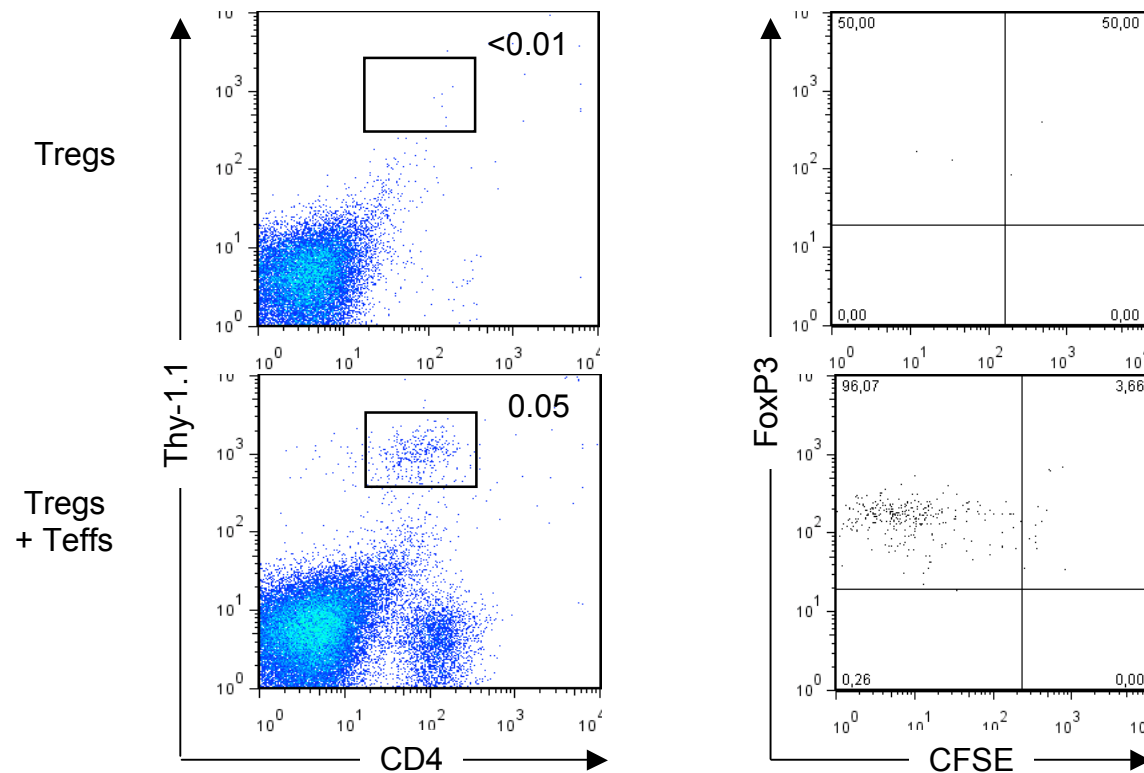


research article

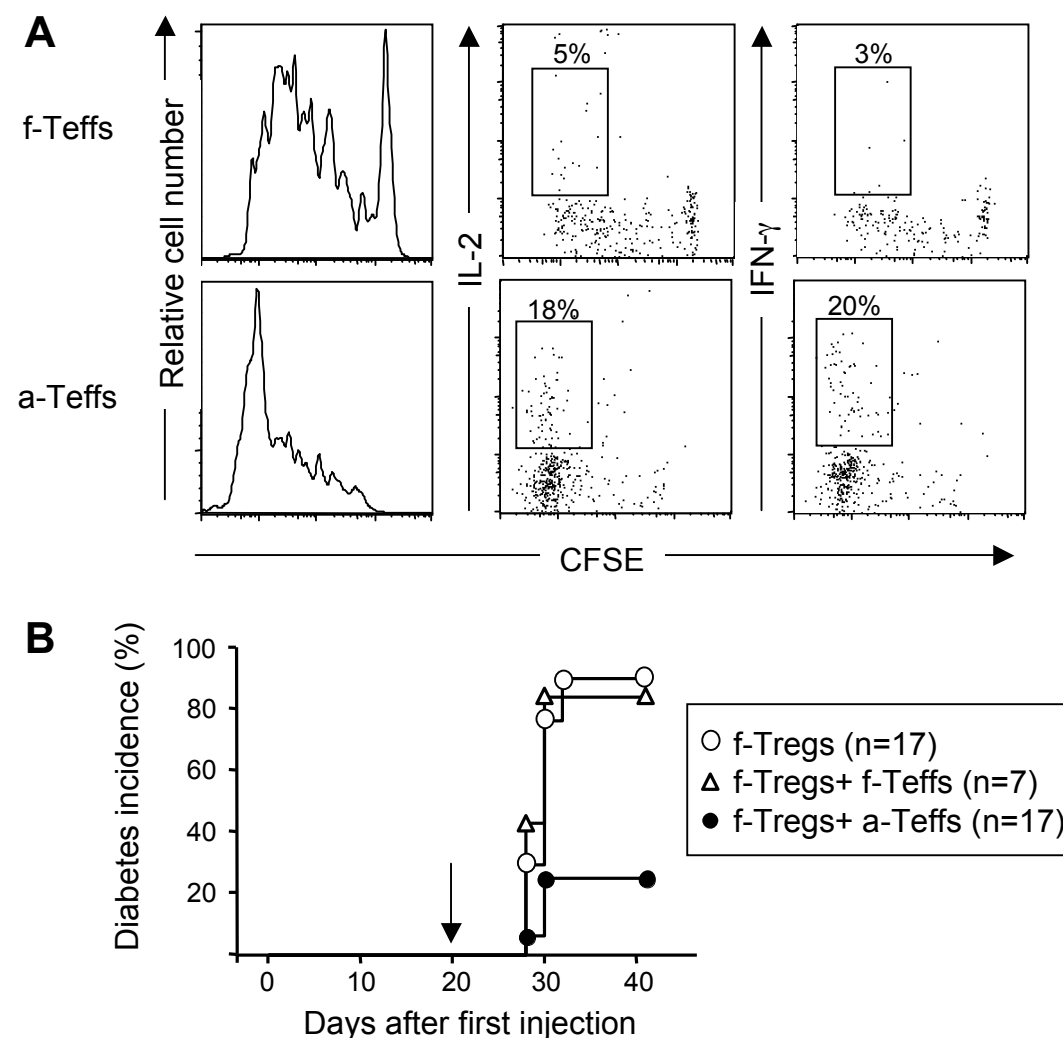
1. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J Immunol.* 2004;172(10):5967–5972.
2. Horwitz MS, Bradley LM, Harbertson J, Krah T, Lee J, Sarvetnick N. Diabetes induced by Cocksackie virus: initiation by bystander damage and not molecular mimicry. *Nat Med.* 1998;4(7):781–785.
3. Christen U, von Herrath MG. Initiation of autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2004;16(6):759–767.
4. Gabrysova L, et al. Negative feedback control of the autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. *J Exp Med.* 2009;206(8):1755–1767.
5. Cuffy MC, et al. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in vascular smooth muscle cells by interferon-gamma contributes to medial immunoprivilege. *J Immunol.* 2007;179(8):5246–5254.
6. Zhu C, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1245–1252.
7. Salomon B, et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* 2000;12(4):431–440.
8. Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol.* 2007;8(2):191–197.
9. Lahl K, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med.* 2007;204(1):57–63.
10. Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science.* 2008;320(5880):1220–1224.
11. Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.* 2009;30(5):636–645.
12. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11(1):7–13.
13. Curiel TJ, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004;10(9):942–949.
14. Cao D, van Vollenhoven R, Klareskog L, Trollmo C, Malmstrom V. CD25brightCD4+ regulatory T cells are enriched in inflamed joints of patients with chronic rheumatic disease. *Arthritis Res Ther.* 2004;6(4):R335–R346.
15. Miyara M, et al. The immune paradox of sarcoidosis and regulatory T cells. *J Exp Med.* 2006;203(2):359–370.
16. Uhlig HH, et al. Characterization of Foxp3+CD4+CD25+ and IL-10-secreting CD4+CD25+ T cells during cure of colitis. *J Immunol.* 2006;177(9):5852–5860.
17. Korn T, et al. Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med.* 2007;13(4):423–431.
18. McLachlan JB, Catron DM, Moon JJ, Jenkins MK. Dendritic cell antigen presentation drives simultaneous cytokine production by effector and regulatory T cells in inflamed skin. *Immunity.* 2009;30(2):277–288.
19. Belkaid Y, Tarbell K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions (*). *Annu Rev Immunol.* 2009;27:551–589.
20. Huehn J, et al. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naive- and effector/memory-like CD4+ regulatory T cells. *J Exp Med.* 2004;199(3):303–313.
21. Yamazaki S, et al. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;198(2):235–247.
22. Fehervari Z, Sakaguchi S. Control of Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol.* 2004;16(12):1769–1780.
23. Darrasse-Jeze G, et al. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells in vivo. *J Exp Med.* 2009;206(9):1853–1862.
24. Takahashi T, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998;10(12):1969–1980.
25. Thornton AM, Shevach EM. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* 2000;164(1):183–190.
26. Billiard F, et al. Regulatory and effector T cell activation levels are prime determinants of in vivo immune regulation. *J Immunol.* 2006;177(4):2167–2174.
27. Klein L, Khazaie K, von Boehmer H. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(15):8886–8891.
28. Walker LS, Chodos A, Eggens M, Dooms H, Abbas AK. Antigen-dependent proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med.* 2003;198(2):249–258.
29. Fisson S, et al. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med.* 2003;198(5):737–746.
30. Morgan DJ, Kreuwel HT, Sherman LA. Antigen concentration and precursor frequency determine the rate of CD8+ T cell tolerance to peripherally expressed antigens. *J Immunol.* 1999;163(2):723–727.
31. Koch MA, Tucker-Heard G, Perdue NR, Killebrew JR, Urdahl KB, Campbell DJ. The transcription factor T-bet controls regulatory T cell homeostasis and function during type 1 inflammation. *Nat Immunol.* 2009;10(6):595–602.
32. Fisson S, et al. Therapeutic potential of self-antigen-specific CD4+ CD25+ regulatory T cells selected in vitro from a polyclonal repertoire. *Eur J Immunol.* 2006;36(4):817–827.
33. Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell.* 1993;74(6):1089–1100.
34. Haskins K, Portas M, Bergman B, Lafferty K, Bradley B. Pancreatic islet-specific T-cell clones from nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(20):8000–8004.
35. Tang Q, et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity.* 2008;28(5):687–697.
36. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med.* 2005;201(5):723–735.
37. Zhang H, et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Med.* 2005;11(11):1238–1243.
38. Walsh PT, et al. PTEN inhibits IL-2 receptor-mediated expansion of CD4+ CD25+ Tregs. *J Clin Invest.* 2006;116(9):2521–2531.
39. O’Gorman WE, et al. The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells. *J Immunol.* 2009;183(1):332–339.
40. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol.* 2009;10(7):689–695.
41. Rauer H, et al. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). *J Biol Chem.* 2010;285(10):7394–7404.
42. Chen X, Baumeister M, Mannel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007;179(1):154–161.
43. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 2005;6(4):353–360.
44. O’Connor RA, Malpass KH, Anderton SM. The inflamed central nervous system drives the activation and rapid proliferation of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2007;179(2):958–966.
45. McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 2005;175(5):3025–3032.
46. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol.* 2006;177(1):192–200.
47. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2005;6(11):1142–1151.
48. Grinberg-Bleyer Y, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med.* 2010;207(9):1871–1878.
49. Harnaha J, et al. Interleukin-7 is a survival factor for CD4+ CD25+ T-cells and is expressed by diabetes-suppressive dendritic cells. *Diabetes.* 2006;55(1):158–170.
50. Ito T, et al. Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity.* 2008;28(6):870–880.
51. Elpek KG, Yolcu ES, Franke DD, Lacelle C, Schabowsky RH, Shirwan H. Ex vivo expansion of CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J Immunol.* 2007;179(11):7295–7304.
52. Kassiotis G, Kollias G. Uncoupling the proinflammatory from the immunosuppressive properties of tumor necrosis factor (TNF) at the p55 TNF receptor level: implications for pathogenesis and therapy of autoimmune demyelination. *J Exp Med.* 2001;193(4):427–434.
53. Liu J, et al. TNF is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nat Med.* 1998;4(1):78–83.
54. McDevitt H, Munson S, Ettinger R, Wu A. Multiple roles for tumor necrosis factor- α and lymphotoxin α/β in immunity and autoimmunity. *Arthritis Res.* 2002;4 suppl 3:S141–S152.
55. Study-group. TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology.* 1999;53(3):457–465.
56. Suvannavejh GC, Lee HO, Padilla J, Dal Canto MC, Barrett TA, Miller SD. Divergent roles for p55 and p75 tumor necrosis factor receptors in the pathogenesis of MOG(35-55)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 2000;205(1):24–33.
57. Strom TB, Koulmanda M. Cytokine related therapies for autoimmune disease. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(6):676–681.
58. Kirberg J, Baron A, Jakob S, Rolink A, Karjalainen K, von Boehmer H. Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor. *J Exp Med.* 1994;180(1):25–34.



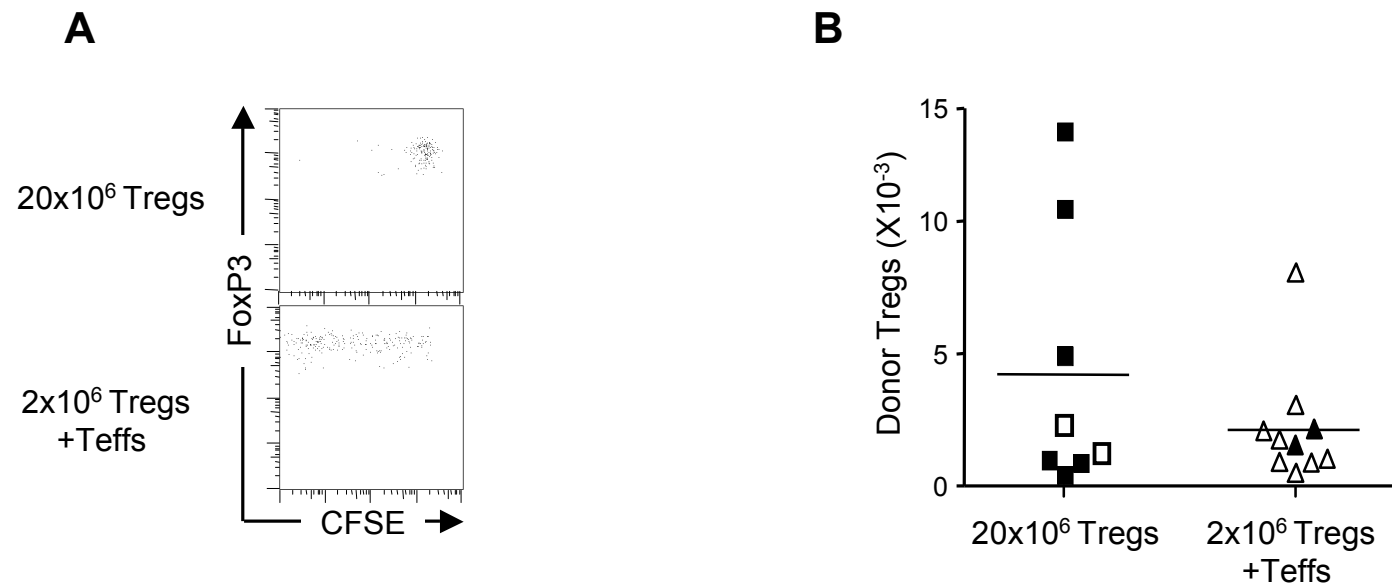
Supplemental Figure 1. In vitro Treg expansion and phenotype of expanded boosted Tregs. **(A)** In vitro expansion of purified HA-Tregs stimulated by HA-pulsed DCs. Viable cell numbers were determined after trypan blue staining. **(B)** The in vitro suppressive activity of HA-Tregs was determined after 3 weeks of culture. HA-Teffs (10^5 cells) stimulated by DCs (2×10^4 cells) and anti-CD3 mAb ($1 \mu\text{g/ml}$ of 2C11) were co-cultured with various numbers of *in vitro* expanded HA-Tregs for 68 hours in flat bottom 96 well plates. Proliferation was measured by thymidine DNA incorporation during the last 12 hours. **(C)** Ins-HA mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ *in vitro* expanded HA-Tregs alone or co-transferred with pre-activated HA-Teffs. Representative expression out of 3 independent experiments of the indicated markers on donor Tregs (CD4⁺Thy-1.1⁺) in PLNs 7 days after cell injection. Horizontal dashed lines delineate positive staining.



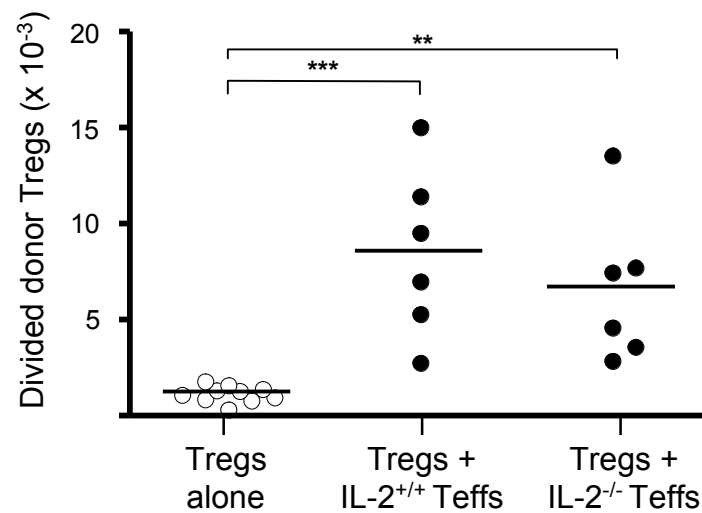
Supplemental figure 2. High numbers of divided islet-specific Tregs in the pancreas of mice co-transferred with islet-specific Teffs and Tregs. Ins-HA mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1+ expanded HA-Tregs alone (Tregs) or with pre-activated HA-Teffs (Tregs +Teffs). Representative dot plot of CD4 vs Thy-1.1 among total lymphocytes (left) and CFSE vs FOXP3 within CD4+Thy-1.1+ cells (right) in the pancreatic islets 7 days after transfer. Data were representative of 3 independent experiments with 2 to 3 mice per group.



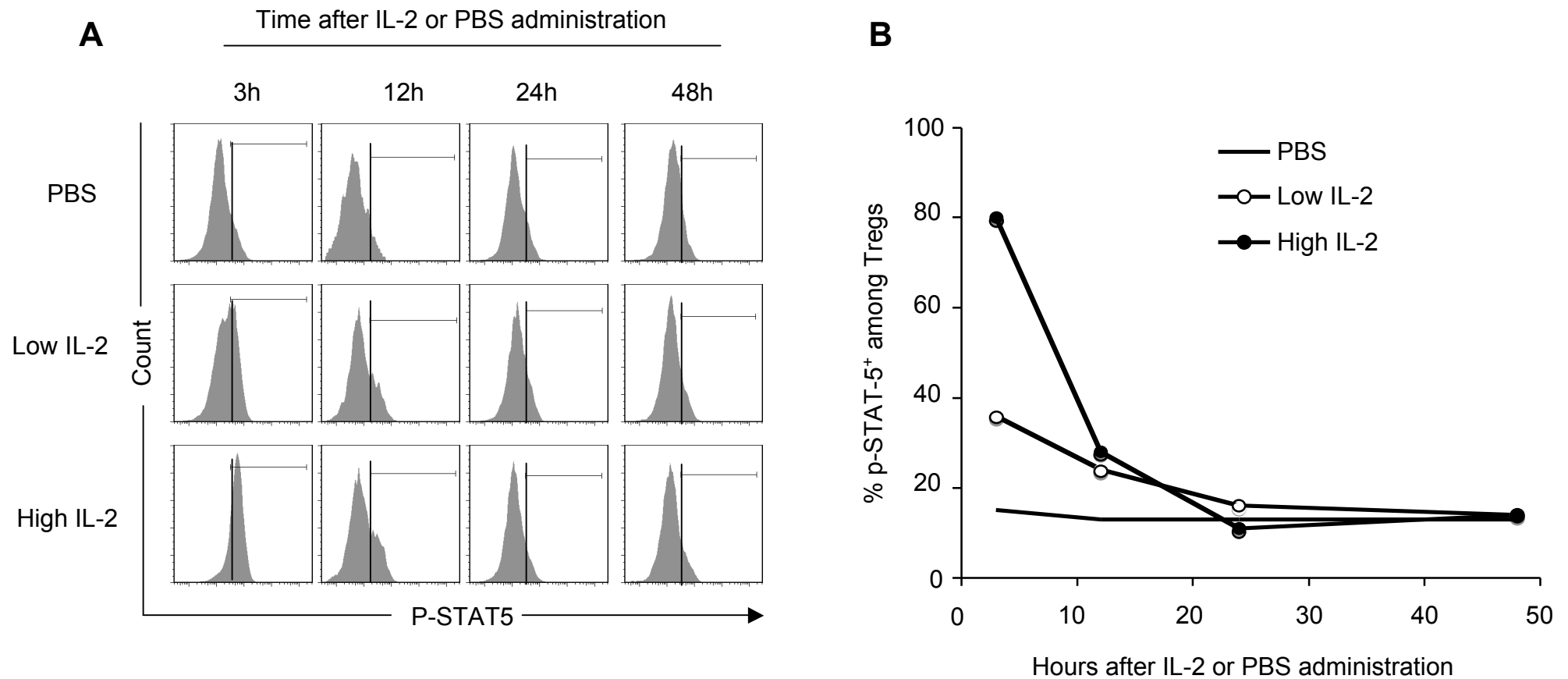
Supplemental Figure 3. Pre-activated, but not freshly-purified HA-Teffs, were strongly re-activated in PLNs of ins-HA mice and induced long-term protection from diabetes challenge when combined with freshly purified Tregs. **(A)** Four days after injection of CFSE-labeled Thy-1.1⁺ freshly purified HA-Teffs (f-Teffs) or pre-activated HA-Teffs (a-Teffs), ins-HA mice were sacrificed for analyses of CFSE profile, IL-2 and IFN- γ production among CD4⁺Thy-1.1⁺ cells in PLNs. Representative data out of 4 experiments. **(B)** Ins-HA mice were transferred with freshly purified HA-Tregs alone or co-injected with freshly purified HA-Teffs or pre-activated HA-Teffs. Three weeks later (arrow), mice were challenged with pre-activated HA-Teffs, to test their sensitivity to diabetes. Data were pooled from 5 independent experiments.



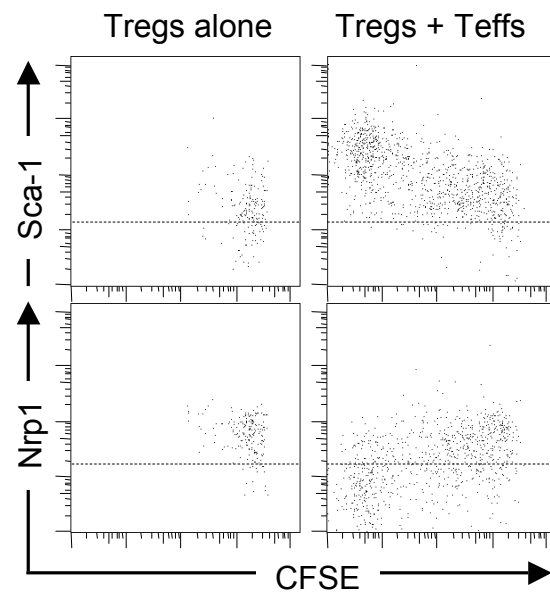
Supplemental Figure 4. Numbers of boosted and non-boosted Tregs 3 weeks after transfer. Ins-HA mice were transferred with 20 x 10⁶ CFSE-labeled expanded Thy-1.1⁺ HA-Tregs alone, or with 2 x 10⁶ CFSE-labeled expanded Thy-1.1⁺ HA-Tregs and 2 x 10⁶ pre-activated HA-Teffs. Mice were sacrificed either at day 19 or were challenged with pre-activated HA-Teffs at day 19 and sacrificed 4 days after for flow cytometry analyses in PLNs. **(A)** Representative profile of FoxP3 staining vs CFSE dilution among donor-Tregs (CD4⁺Thy-1.1⁺FoxP3⁺) at day 19. **(B)** Absolute number of donor Tregs (CD4⁺Thy-1.1⁺FoxP3⁺ cells) before (□,△) and after (■,▲) the challenge with HA-Teffs. Each symbol represents an individual mouse from 3 independent experiments.



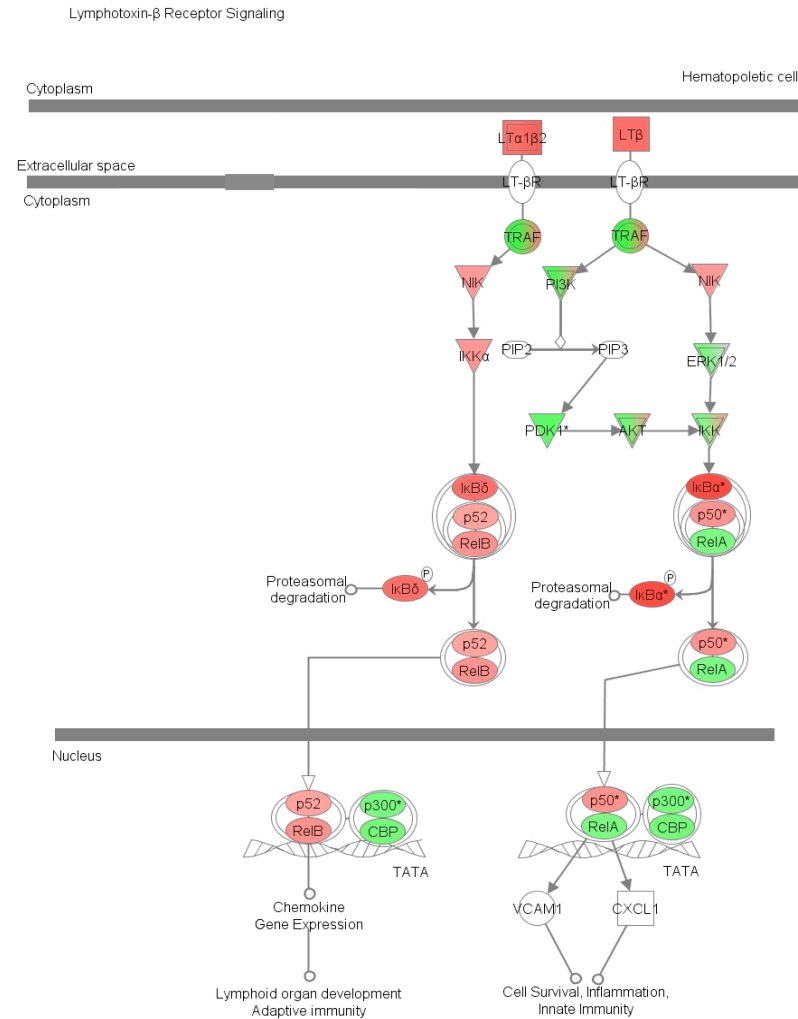
Supplemental Figure 5. IL-2 deficient Teffs strongly boost freshly purified Tregs. Ins-HA mice were transferred with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ freshly purified HA-Tregs alone (Tregs alone) or co-injected with IL-2^{+/+} or IL-2^{-/-} pre-activated HA-Teffs. Divided HA-Treg numbers (CFSE^{dim}CD4⁺Thy-1.1⁺ cells) were quantified in PLNs 10 days later. Each dot represents individual mice from at least 2 independent experiments. ***p<0.0001; **p<0.001.



Supplemental Figure 6. Persistence of p-STAT-5 signal after IL-2 administration. Percentage of p-STAT-5⁺ cells among FoxP3⁺ cells were determined by flow cytometry various time after one i.p. injection of low (25,000 IU) or high (250,000 IU) dose of human IL-2 in BALB/c mice. (A) Representative STAT-5 staining among Tregs (CD4⁺FoxP3⁺). Bars delimitate positive staining. (B) Percentage of p-STAT-5⁺ cells among Tregs (CD4⁺FoxP3⁺).

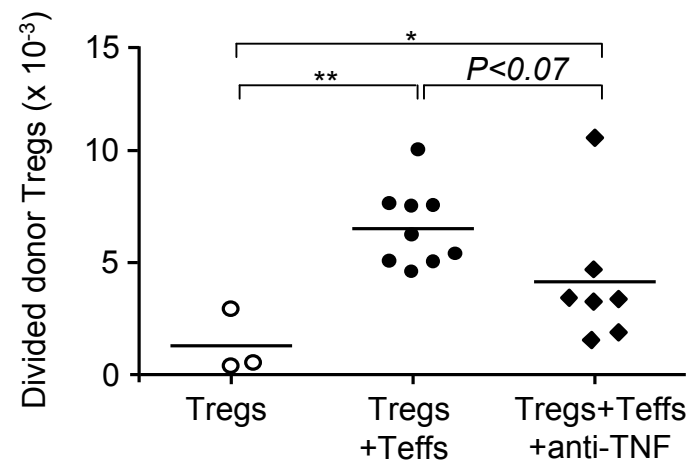


Supplemental Figure 7. HA-Tregs boosted *in vivo* acquired phenotypic modifications as *in vitro*. Ins-HA mice were transferred with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ expanded HA-Tregs alone or were co-transferred with pre-activated HA-Teffs. Expression of Sca-1 and Nrp1 on donor Tregs (CD4⁺Thy-1.1⁺FoxP3⁺) was assessed 10 days later. Representative data of 2 independent experiments.

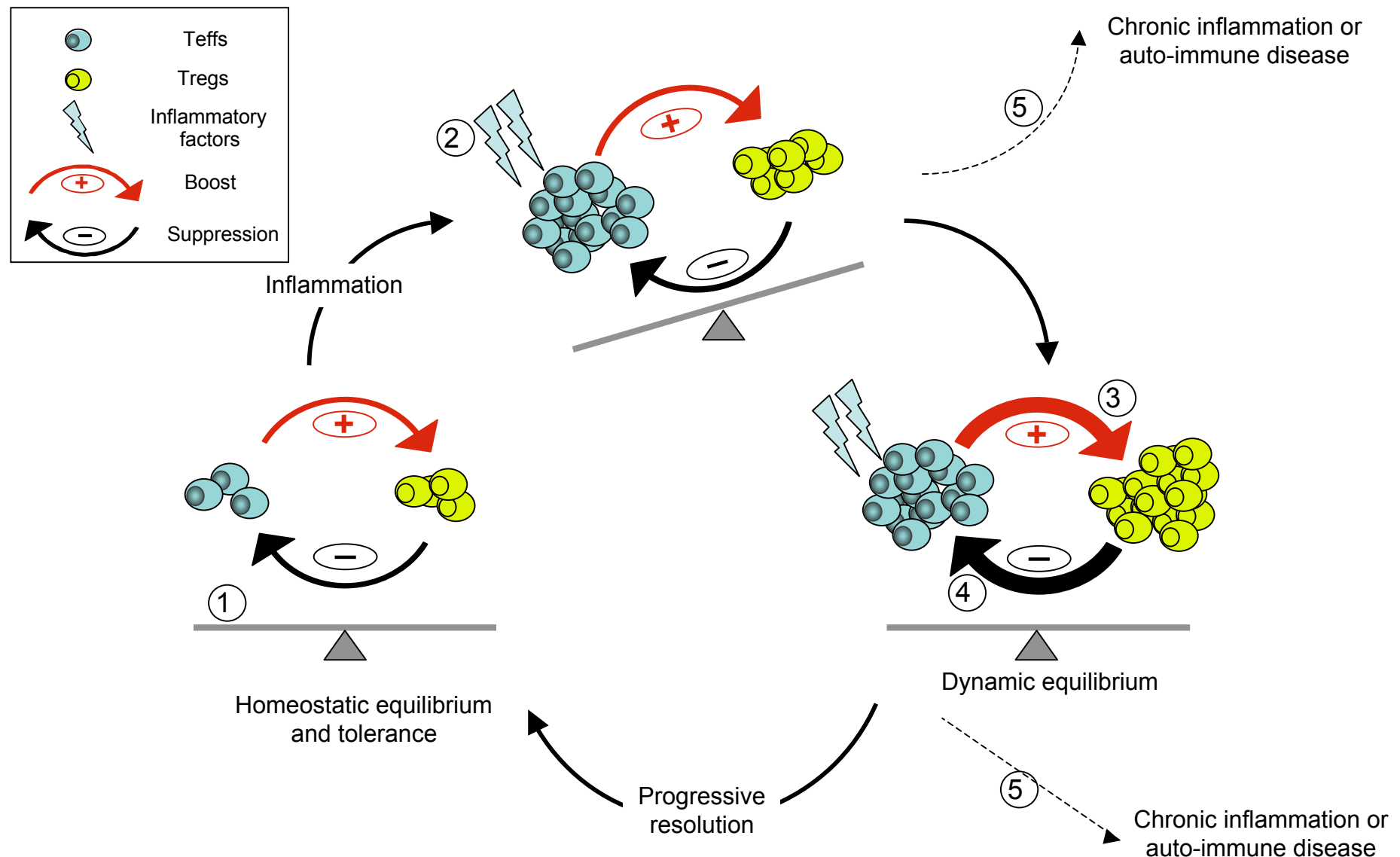


© 2000-2009 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Supplemental Figure 8. Boosted Tregs upregulated the expression of molecules of the alternative NF- κ B pathway. Graphic representation of the NF- κ B signaling pathway downstream of the lymphotoxin- β receptor. Genes are represented as nodes, and the biological relationship between two nodes is represented as an edge (line). The node color indicates the degree of up- (red) or down- (green) regulation of gene expression in boosted Tregs versus non-boosted Tregs generated from the transcriptome data and analyzed using the Ingenuity software.



Supplemental Figure 9. The Teff→Treg boost was inhibited by an anti-TNF- α mAb. Four to 6 week-old NOD mice were transferred with freshly isolated CFSE-labelled CD45.2+ BDC2.5-Tregs alone or with pre-activated CD45.1+ BDC2.5-Teffs with or without an anti-TNF- α mAb treatment. Absolute numbers of divided donor Tregs (CFSE^{dim}CD4⁺CD45.2⁺FoxP3⁺ cells) were quantified in PLNs 5-6 days after transfer. Each dot represents individual mice pooled from 3 independent experiments. *p<0.05, **p<0.001.



Supplemental Figure 10. A new model of regulation in inflammation and auto-immunity. At the steady state (1), rare auto-reactive Teffs and Tregs co-exist in lymphoid tissues, generating a homeostatic Teff/Treg equilibrium and tolerance. During sustained inflammation (2), Teffs are strongly activated. These cells thus produce or induce factors favoring a strong Teff→Treg boost (3), leading to subsequent Treg expansion. This expansion strengthens Treg-mediated suppression exerted on Teffs (4). This inhibition of Teff activation probably reduces Treg boost factors, eventually leading to a progressive resolution and a return to the basal homeostatic Teff/Treg equilibrium. In some conditions, the response may progress toward chronic inflammation or autoimmune disease (5). This may be due to either ineffective Treg-mediated suppression or a defect of the Teff→Treg boost.

Ingenuity Canonical Pathways	-Log(P-value)	Ratio	Molecules
Glycolysis/Gluconeogenesis	3,99E+00	4,96E-02	TPI1, ACSS1, PFKL, ENO3, PFKP, HK2, GALK1
Fructose and Mannose Metabolism	3,92E+00	3,60E-02	TPI1, PFKL, PFKP, HK2, GALK1
Galactose Metabolism	2,80E+00	3,57E-02	PFKL, PFKP, HK2, GALK1
CD40 Signaling	2,67E+00	7,35E-02	NFKBIA, FOS, ICAM1, TRAF5, LTA
CCR5 Signaling in Macrophages	2,64E+00	5,81E-02	CCL4, FOS, CCL5, CCL3, GNG12
CD27 Signaling in Lymphocytes	2,47E+00	8,16E-02	NFKBIA, FOS, TRAF5, CD70
Lymphotoxin β Receptor Signaling	2,12E+00	7,02E-02	LTB, NFKBIA, TRAF5, LTA
Antigen Presentation Pathway	2,08E+00	7,69E-02	CALR, HLA-DQB2, HLA-DRA
Activation of IRF by Cytosolic Pattern Recognition Receptors	1,86E+00	5,48E-02	ZBP1, NFKBIA, ISG15 (includes EG:9636), LTA
Chemokine Signaling	1,69E+00	5,19E-02	CCL4, CXCR4, FOS, CCL5
p53 Signaling	1,43E+00	4,60E-02	SERPINE2, GADD45G, GADD45B, E2F1
Glycosphingolipid Biosynthesis - Neolactoseries	1,40E+00	2,99E-02	ST8SIA4, ST3GAL6
Eicosanoid Signaling	1,32E+00	3,57E-02	PTGER2, ALOX5AP, AKR1C3
Glucocorticoid Receptor Signaling	1,21E+00	2,54E-02	ADRB2, NFKBIA, FOS, ICAM1, CCL5, CCL3, ANXA1
4-1BB Signaling in T Lymphocytes	1,11E+00	5,41E-02	NFKBIA, TNFRSF9
Aryl Hydrocarbon Receptor Signaling	8,53E-01	2,58E-02	FOS, MCM7, TGM2, E2F1
IL-6 Signaling	8,48E-01	3,12E-02	NFKBIA, FOS, IL6R
CXCR4 Signaling	8,05E-01	2,44E-02	CXCR4, FOS, EGR1, GNG12
IL-2 Signaling	7,47E-01	3,57E-02	IL2RB, FOS
G-Protein Coupled Receptor Signaling	5,00E-01	1,86E-02	ADRB2, P2RY1, NFKBIA, DUSP4
NF- κ B Signaling	4,90E-01	2,08E-02	NFKBIA, TRAF5, LTA
IL-8 Signaling	3,79E-01	2,19E-02	ICAM1, MMP9, PLD4, GNG12
Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	3,79E-01	1,61E-02	NFKBIA, FOS, GNG12
Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	3,62E-01	2,33E-02	CDC25B

Supplemental Table 1. Top canonical pathways differently used by boosted Tregs. Gene array data were processed using Ingenuity pathway analysis software. The table shows the canonical pathways, identified from the Ingenuity canonical pathways library, that were most significant to the data set according to the following 2 criteria: 1) Fischer's exact test was used to calculate a p-value determining the probability that the association between the genes in the dataset and the canonical pathway is explained by chance alone ("Log(P-value)"). 2) A ratio of the number of genes from the data set that map to the pathway divided by the total number of genes that map to the canonical pathway is displayed ("Ratio"). "Molecules" show the genes from the data set included in the corresponding canonical pathway

Characterization of the boost of regulatory T cell activation by effector T cells

Audrey Baeyens*, David Saadoun*, Fabienne Billiard, Angéline Rouers, Sylvie Gregoire, Yenkel Grinberg, Eliane Piaggio and Benoît L. Salomon

Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7087, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, F75013 France.

Corresponding authors : Benoît Salomon. CNRS/UPMC UMR 7211, CERVI, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France. Phone: (+33) 1 42 17 74 66. Fax: (+33) 1 42 17 74 41. The editorial and production offices should contact Benoît Salomon.

E-mail addresses: benoit.salomon@upmc.fr

Nonstandard abbreviations used: Teff cell, effector T cell; Treg cell, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T-cell; HA, hemagglutinin.

Abstract: The CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells play a major role in peripheral tolerance. Their biology and suppressive function is influenced by environment cues. Among them, effector T cells are able to boost their expansion, which is partially dependent on TNF α or IL-2. Here, we further characterized conditions in which a Teff cell dependent Treg cell boost was effective and analyzed its mechanism. This phenomenon could be observed in a context of high as well as low inflammation. It requires that both Treg and Teff cells were activated by their cognate antigen, being either the same or different. Also, when Treg cells highly proliferate on their own, they could no longer being boosted by Teff cells. In a condition of low inflammation, the Teff cell dependent Treg cell boost involved TNF α , OX40L and plasmacytoid dendritic cells, whereas in a condition of high inflammation, it involved TNF α and IL-2. Thus, not only Treg cells suppress Teff cells, but Teff cells are able to boost Treg cells, which depends on the immune context for its effectiveness and mechanism. This feedback regulatory loop between Teff cells and Treg cells may be crucial to limit some immune responses.

Introduction

When it functions properly, the immune system is able to mount strong inflammation and high activation of innate and adaptive immune responses while maintaining tissue integrity on the long term. This requires complex cellular and molecular networks with multiple feedforward and feedback mechanisms to amplify and regulate various responses, respectively. The balance between Foxp3+CD4+CD25+ regulatory T cells (Treg cells) and effector T cells (Teff cells) determines the level of immune regulation [1]. Seminal recent works have shown that the homeostasis and suppressive activity of Treg cells is highly influenced by environment cues, modeling diverse Treg cell subset populations in different milieus having different functions [2-4]. Some of these signals are provided by activated Teff cells, indexing Treg-mediated suppression to Teff cell activation [5]. Among them, interleukin-2 (IL-2) plays a central role since this cytokine is critical in thymic and peripheral differentiation, survival, proliferation and suppressive activity of Treg cells [6]. We showed recently that Teff cell activation was able to boost Treg cell expansion, a phenomenon thereafter called Teff → Treg boost [7]. This was observed in pancreatic LN (pan-LN) after adoptive co-transfer of Teff and Treg cells specific for a model antigen expressed in pancreatic islet β -cells. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) was involved in this boost since neutralization of the cytokine partly suppressed this boost by IL-2 independent mechanism [7].

Here, we have determined conditions impacting on the Teff → Treg boost showing that it is not any more observed when Treg cells highly proliferate on their own. We also reveal that this Treg boost involves the OX40L TNF family member in addition to TNF α , as well as IL-2 and plasmacytoid dendritic cells (pDC) depending on the context.

Results

OX40/OX40L pathway is involved in the Teff→Treg boost in ins-HA mice.

We first observed the Teff→Treg boost in transgenic mice expressing the hemagglutinin (HA) of *Influenza* virus under the control of the insulin promoter, conferring specific HA expression in the pancreas. In these ins-HA transgenic mice, adoptively transferred Treg cells specific for the HA₁₁₁₋₁₁₉ peptide (HA₁₁₁-Treg cells) poorly proliferate in the draining pancreatic lymph nodes (pan-LN) at day 7. The co-transfer of HA₁₁₁-Teff cells induced a high increase of the proliferation and expansion of HA₁₁₁-Treg cells in the pan-LN. This Teff→Treg boost was only partially dependent on TNFα [7], suggesting that other pathways were involved. Using the same system, we analyzed the role of OX40 since this other TNF receptor (TNFR) family member is able to boost Treg cell expansion [8]. HA₁₁₁-Teff cells and HA₁₁₁-Treg cells were adoptively transferred into ins-HA recipient mice with or without a neutralizing anti-OX40L monoclonal antibody (mAb) treatment to block the OX40 pathway. Compared to control, blocking OX40 significantly reduced the Teff→Treg boost in pan-LN, although it was not fully abolished. This reduction was characterized by a partial decrease of Treg cell proliferation (**Figure 1a**) and numbers of divided donor HA₁₁₁-Treg cells (**Figure 1b**). Importantly, proliferation and expansion of HA₁₁₁-Teff cells were not significantly reduced in the presence of the anti-OX40L mAb (**Figure 1 c, d**). This control experiment suggests that the reduced Treg boost observed with the neutralizing Ab was not merely due to reduced HA₁₁₁-Teff cell activation. We then blocked simultaneously the TNFR, using the TNFR2-Fc soluble receptor antagonist, and OX40 using the neutralizing anti-OX40L mAb. Combining the 2 treatments did not have an additive inhibitory effect on the Teff→Treg boost since numbers of divided Treg cells were similarly reduced in the presence of blocking TNFR alone, OX40 alone or when

combined (**supplemental Figure 1**). Altogether, our data showed that, in addition to TNFR, the OX40 pathway was involve in the Teff→Treg boost in the ins-HA model.

pDC are involved in the Teff→Treg boost in ins-HA mice.

pDC seem to be involved in Treg cell expansion in an inflammatory contexts [9]. We thus tested the role of these DC in the Teff→Treg boost by injecting a depleting mAb. HA₁₁₁-Teffs and HA₁₁₁-Tregs were injected in ins-HA mice in the presence or not of the mAb, which induced a profound pDC depletion, identified by expression of Siglec H, in pan-LN (**Figure 2a**) and the spleen (**Supplemental Figure 2**). In control groups, the co-transfer of HA₁₁₁-Teff cells boosted HA₁₁₁-Treg cells in pan-LN at day 7, as expected. When pDC were depleted, this Teff→Treg boost was significantly reduced, with decreased proliferation (**Figure 2b**) and 6-fold lower numbers of divided HA₁₁₁-Treg cells (**Figure 2c**). This reduced Treg cell boost was not merely due to a lower HA₁₁₁-Teff cells activation since neither proliferation nor numbers of divided Teff cells were significantly reduced upon pDC depletion (**Figure 2d, e**). Thus, pDC were involved in the Teff→Treg boost in the ins-HA model.

Teff cell boost of Treg cells in an inflammatory environment

After characterization of the Teff→Treg boost phenomenon in ins-HA mice, we wondered if it could be observed in other contexts. We thus analyzed Treg cell proliferation after adoptive transfer of T cells specific for HA₁₂₆ and HA₁₁₁ peptides presented by MHC class II A^d and E^d, respectively, in various experimental settings. T cells were stimulated by injection of their cognate antigen emulsified in complete Freund adjuvant (CFA) or of peptide-pulsed DC in rear footpad in normal BALB/c mice. When HA₁₂₆-Treg cells were injected alone and mice

immunized with HA₁₂₆ emulsified in CFA (CFA/HA₁₂₆), cells weakly proliferated in the draining popliteal LN (pop-LN) at day 4, and not in non-draining LN (not shown). The co-transfer of HA₁₂₆-Teff cells induced a 3.5-fold-increase of divided HA₁₂₆-Treg cell numbers (**Figure 3**). A Teff→Treg boost was also observed when Treg cells and Teff cells recognized different epitopes. Indeed, the co-transferred of HA₁₁₁-Teff cells to HA₁₂₆-Treg cells, followed by immunization with HA₁₂₆ and HA₁₁₁ peptides emulsified in CFA (CFA/HA₁₂₆₊₁₁₁), induced a mild but significant increase of HA₁₁₆-Treg cell proliferation and expansion (**Figure 3**).

We next studied other parameters to further characterize conditions required for a Teff→Treg boost. It required that both Teff cells and Treg cells were activated by their cognate antigen, since it was no longer observed when either donor Teffs or Tregs were polyclonal, and consequently hardly activated (**Figure 4a, b**). Then, we assessed the presence of a Teff→Treg boost in contexts in which Treg cells actively proliferated when transferred alone. This was obtained in BALB/c mice transferred with HA₁₂₆-Treg cells and immunized with HA₁₂₆ pulsed-DC (DC/HA₁₂₆) or in mice transferred with HA₁₁₁-Treg cells and immunized with CFA/HA₁₁₁ (**Figure 4b**). In these two settings, the co-transfer of HA₁₁₁-Teff cells or HA₁₂₆-Teff cells did not boost donor Treg cells in the draining LN at day 4 (**Figure 4a**). These data suggest that a Teff→Treg boost was obtained only when Treg cells weakly proliferate on their own. To confirm this hypothesis, we co-transferred HA₁₁₁-Treg cells and HA₁₂₆-Teff cells and immunized mice with fixed amount of HA₁₂₆ peptide and decreasing amounts of the HA₁₁₁ peptide in CFA. At 2μg of HA₁₁₁ peptide, HA₁₁₁-Treg cells highly proliferated and were not boosted by HA₁₂₆-Teff cells. At 0.02μg of HA₁₁₁ peptide, HA₁₁₁-Treg cell proliferation was reduced and they were boosted by HA₁₂₆-Teff cells. At 0.006μg of HA₁₁₁ peptide, HA₁₁₁-Treg cells very weakly proliferated and were not anymore boosted by HA₁₂₆-Teff cells (**Figure 4c, d**). Together, these experiments

showed that a Teff→Treg boost could be also observed in a highly inflammatory environment, as induced by CFA, but required that Treg and Teff cells were both activated. However, if Treg cell activation was high on its own, co-transfer of Teff cells did not boost them. In other words, when highly activated, Treg cells could no longer be helped by Teff cells.

Bystander effect of the Teff→Treg boost

So far, we have studied the Teff→Treg boost when both cells were stimulated in the same draining LN, pan-LN in ins-HA mice and pop-LN in BALB/c. We then tested whether it was a systemic or by-stander phenomenon. To address this question, we took advantage of the fact that a Treg boost could be observed when using HA₁₂₆-Treg cells and HA₁₁₁-Teff cells stimulated in the same pop-LN after footpad immunization with CFA/HA₁₂₆₊₁₁₁ (**Figure 4a**). When mice were similarly co-transferred with HA₁₂₆-Treg cells and HA₁₁₁-Teff cells but then immunized with CFA/HA₁₂₆ in the right rear footpad and CFA/HA₁₁₁ in the left rear footpad (**Figure 5a**), HA₁₂₆-Treg cells weakly proliferated in the pop-LN draining the HA₁₂₆ peptide, but their activation was not increased by HA₁₁₁-Teff cells activated in the contra-lateral pop-LN, even if 30 times more HA₁₁₁-Teff cells were injected (**Figure 5b, c**). Notably, when we analyzed HA₁₂₆-Treg proliferation in the far draining loco-regional LN (right inguinal LN) of the same mice, in which they hardly proliferated on their own, the co-transfer of Teff cells boosted these Treg cells in a dose-dependent manner (**Figure 5b, c**). Interestingly, activated HA₁₁₁-Teff cells were readily observed in the right inguinal and pop-LN due to re-circulation after their initial activation in the left draining LNs, with numbers increasing as a function of injected cell numbers (**Supplemental figure 3**). Numbers of activated HA₁₁₁-Teff cells were not higher in the inguinal LN -site where a Treg boost was observed- than in pop-LN. Collectively, a Teff→Treg boost in BALB/c mice was

observed when Teff and Treg cells were activated in distal LN only if Treg cells minimally proliferated on their own.

TNF α and IL-2 are involved in the Teff→Treg boost in an inflammatory environment.

After the characterization of conditions required for a Teff→Treg boost in the BALB/c model, we assessed its mechanism. In the ins-HA model, TNF α and pDC but not IL-2 were involved in the Teff→Treg boost ([7] **and Figure 1 and 2**). We thus tested these different factors in the Teff→Treg boost observed in inflammatory condition. BALB/c mice were transferred with HA₁₂₆-Treg cells alone or co-transferred with HA₁₁₁-Teff cells, followed by CFA/HA₁₂₆₊₁₁₁ immunization. To test the role of pDC, mice were injected with a depleting mAb, which induced a partial pDC depletion in the pan-LN (**Figure 6a, b**) and the spleen (data not shown). This depletion led to a tendency toward reduced Teff→Treg boost, which was not significant (**Figure 6c**). Expansion of HA₁₁₁-Teff was unaffected by pDC depletion (**Figure 6d**). Since pDC depletion was only partial, it was difficult to conclude on the role of these cells in the boost.

To role of IL-2 cannot be properly evaluated by using an anti-IL-2 neutralizing mAb because this cytokine is critical for in vivo Treg cells survival. Thus, injection of an anti-IL-2 blocking mAb induces a rapid loss of the cells [10]. That is why we used IL-2 deficient HA₁₁₁-Teff obtained from TCR-HA₁₁₁ x IL-2^{-/-} mice. An important control experiment was to measure expansion and IL-2 production by these Teff cells. In BALB/c mice immunized with CFA/HA₁₁₁, expansion of transferred IL-2-deficient HA₁₁₁-Teff cells was similar to IL-2-sufficient HA₁₁₁-Teff cells and former the cells did not expressed IL-2 whereas the cytokine was clearly detected in the latter cells (**Figure 7a**). Then the Teff→Treg boost was evaluated. In the control group, the co-transfer of IL-2-sufficient HA₁₁₁-Teff cells increased expansion of HA₁₂₆-Treg as expected.

Interestingly, the Teff→Treg boost was significantly reduced, but still effective, when IL-2-deficient HA₁₁₁-Teff cells were co-transferred (**Figure 7b**). Because IL-2 deficient mice spontaneously develop a massive lymphoproliferation [11], one may argue that the function of IL-2 deficient mice Teff cells may be altered, hampering their capacity to boost Treg cells. This was unlikely because when these mice were crossed with TCR-HA₁₁₁ transgenic mice, the lymphoproliferative disease was significantly delayed [12]. Indeed, IL-2-deficient TCR-HA₁₁₁ mice were free of disease at 6-7 weeks of age, when we sacrificed them for experiments. To definitively rule out a putative undetected intrinsic defect of IL-2 deficient HA₁₁₁-Teff cells, besides their incapacity to produce IL-2, we generated bone marrow chimeric mice composed of a 1/1 ratio of cells from TCR-HA₁₁₁ x IL-2^{-/-} mice and cells from wild type BALB/c mice. These chimeric mice did not develop any signs of lymphoproliferation (data not shown). The co-transfer of Teff cells from these chimeric mice did not increase the expansion of HA₁₂₆-Tregs, confirming that IL-2 produced by Teff cells was necessary to boost Treg cells in this setting. But was IL-2 sufficient? To address this question, we injected IL-2 in BALB/c mice transferred with HA₁₂₆-Treg cells and immunized with CFA/HA₁₂₆. The addition of IL-2, at a dose that induced a biological effects in another setting [13], was not sufficient to increase expansion of HA₁₂₆-Treg cells (**Supplemental figure 4**), suggesting that other factors were involved.

The role of TNF α was assessed by administration of a soluble TNF receptor that neutralize the cytokine. In control mice immunized with CFA/HA₁₂₆₊₁₁₁, the co-transfer of HA₁₁₁-Teff cells boosted expansion of HA₁₂₆-Treg cells, as expected. When TNF α was neutralized, the Teff→Treg boost was not observed any more, with proliferation (**Figure 8a**) and expansion of divided Treg cells similar to the control group transferred with HA₁₂₆-Treg cells alone (**Figure 8b**). Similar results were obtained when using an anti-TNF α mAb that is another

anti-TNF drug (**Supplemental figure 5**). Importantly, proliferation (**Figure 8c**) and expansion (**Figure 8d**) of HA₁₁₁-Teff cells was unaffected by anti-TNF drug administration. In conclusion, we showed that the Teff→Treg boost in the inflammatory context involved both TNF α and IL-2.

Discussion.

The proper functioning of the immune system relies on complex interactions between immune cells. In this work we have further studied a phenomenon that, we and others, have described, which is the capacity of Teff cells to help or boost Treg cell activation [7, 14]. Depending on the system, this boost was shown to be IL-2-dependent or independent. Here, we add two major findings to already published data. We describe immune conditions favorable for a Teff→Treg boost and we further characterize the mechanism of this phenomenon, revealing the involvement of IL-2, TNF α , OX40 and pDC depending on the context.

Conditions for a Teff→Treg boost. What do we learn from our present work on conditions required or favorable for a Teff→Treg boost? One critical parameter seems to be the level of Treg cell expansion when activated on their own. We identified 3 conditions of low level Treg expansion in which co-transfer of Teff cells induced a Treg cell boost: (i) in pan-LN of ins-HA mice injected with HA₁₁₁-Treg cells, (ii) in pop-LN of BALB/c mice injected with HA₁₂₆-Treg cells followed by a CFA/HA₁₂₆ immunization, (iii) and in pop-LN of BALB/c mice injected with HA₁₁₁-Treg cells followed by immunization of low dose HA₁₁₁ emulsified in CFA. On the other side, we characterized 2 conditions of high level of Treg cell expansion, in which co-transfer of Teff cells had no impact of their activation: (i) in pop-LN of BALB/c mice injected with HA₁₂₆-Treg cells followed by a DC/HA₁₂₆ immunization and (ii) in pop-LN of BALB/c mice injected with HA₁₁₁-Treg cells followed by a CFA/HA₁₁₁ immunization. Thus, a Teff→Treg boost phenomenon requires low level of Treg cell activation. In addition, we show here that a Treg boost could be obtained when Treg and Teff cells were specific to different epitopes. This property made possible to test the by-stander versus systemic effect of the boost. When mice were immunized in one rear footpad to stimulate Teff cells and in the other rear footpad to

stimulate the Treg cells, the Teff→Treg boost was still observed but was weak, compared to the boost obtained when both cell types were stimulated in the same LN. We also learned from our study that a Teff→Treg boost required that both Teff and Treg cells were stimulated because it was no longer observed when we transferred polyclonal (either Treg or Teff) cells purified from BALB/c non-transgenic mice. However, in a condition of high and systemic Teff cell activation that induced a burst of IL-2, an increase of proliferation of recipient polyclonal Treg cells was reported [14], as observed after high dose IL-2 administration [15, 16]. It is most likely that this IL-2 dependent boost acts preferentially on the most auto-reactive Treg cells that proliferate at the steady state [10, 13, 17].

From these different findings, we may envisage physiological implications of the Teff→Treg boost phenomenon. In some situations, there is a high Treg cell activation due either to release of high levels of self-reactive cognate antigens or to strong inflammation. Indeed, different soluble and membrane-bound molecules, increased during inflammation, are able to boost Treg cell activation, such as IL-2 [15, 16], GM-CSF [18, 19], CD28 [20, 21] and several members of the TNF family [22]. In these contexts, the Treg cells are highly activated on their own, leading to their expansion and eventually increased immunosuppression without further help from Teff cells. In other contexts of low levels of autoreactivity and inflammation, inducing weak Treg cell proliferation, the persistence of highly activated Teff cells may damage the tissue or ignite an autoimmune disease. That is why indexing the level of Treg cell activation to the level of Teff cell activation may be a feedback regulatory mechanism to limit sustained pathogenic inflammation and return to healthy steady state physiology.

Molecular mechanisms of the Teff→Treg boost.

The molecular mechanisms involved in the Teff→Treg boost vary depending on the context. In the ins-HA mouse setting, we identified a role of TNF α and OX40L whereas in the

BALB/c mouse setting, we identified a role for TNF α and IL-2. Blocking TNF α and OX40L in the first setting did not fully inhibit the Teff \rightarrow Treg boost suggesting that other molecules were involved. It is now clear that there are different Treg cell populations, depending on their environment. The one in LN is not the same as the one in the fat or the intestine... because Treg cell biology is influenced by signals from the tissues and from the inflammatory contexts [3]. Thus, it is likely that signals able to boost Treg cell expansion, some of them coming from Teff cell activation, differ depending on the tissue and the type of inflammation. Thus, the molecular mechanisms of the Teff \rightarrow Treg boost may be diverse and different in various contexts. Besides IL-2, TNF α and OX40L that we pointed out here, one may envisage other putative factors able to play a role, some of them belonging to the TNFR family members that may favor Treg expansion [22]. Conflicting data have been described for some of them. For instance, TNF α promote Treg cell expansion and suppressive activity in some reports [7, 23] but inhibit Treg-mediated suppression in others [24-26]. OX40LGITRL ... Whereas there is no clear explanation for these conflicting data, it is possible that some of them induced only a very short-term inhibition of suppression, associated with Treg expansion, leading to increased Treg population and return to normal suppression.

Role of pDC in the Teff \rightarrow Treg boost.

Part of the Teff \rightarrow Treg boost may be due a direct effect of Teff cells on Treg cells. As shown here, IL-2 or TNF α that are produced by activated Teff cells at high levels may boost directly Treg cells that express high level the high affinity IL-2 receptor and TNFR2. In support of this mechanism, these 2 cytokines are able to directly promote survival and proliferation of Treg cells [6, 23]. Alternatively and none exclusively, Teff cells may modulate or activate

another cell population that itself boost Treg cells. Here, we showed that pDC play a role in this indirect Teff→Treg boost. This result is interesting in regards to the known tolerogenic properties of pDC, partly due to their capacity to induce or activate Treg cells (Matta EJI 40:2667). Indeed, pDC may promote differentiation of peripherally induced Treg cells, mediating mucosal tolerance [27, 28] or tolerance to allografts [29]. Also, mature pDC and pDC present in inflamed tumors, inflamed LN or the lamina propria were able to promote high level of Treg cell expansion [9, 30-32]. It will be interesting to assess whether the acquired capacity of pDC to activated Treg cells in these latter settings rely on Teff cell activation and involve similar mechanisms as in the Teff→Treg boost that we describe here.

Methods

Mice. Six to 8-week-old BALB/cByJ (BALB/c) mice were obtained from Charles River Laboratories France. Ins-HA transgenic mice expressing HA of influenza virus under the control of the insulin promoter [33] were backcrossed > 10 generations onto BALB/c genetic background. The TCR-HA₁₂₆ and the TCR-HA₁₁₁ transgenic mice that express a transgenic TCR recognizing the HA₁₂₆ epitope presented by I-A^d [34] and the HA₁₁₁ epitope presented by I-E^d [35] respectively were backcrossed > 10 generations onto BALB/c genetic background. Some of these mice were bred with Thy-1.1 BALB/c congenic mice and with IL-2 knock out BALB/c mice [36]. For obtaining IL-2 chimeric mice, BALB/c mice were lethally irradiated and engrafted with a mix of bone marrow cells from IL-2 deficient TCR-HA₁₁₁ transgenic mice and BALB/c mice at a 1 to 1 ratio. Experiments were performed at least 6 weeks after bone marrow transplantation. All these mice were bred in our animal facility under specific pathogen-free conditions.

Cell preparation and adoptive transfer. Cells were prepared as previously described [37]. Briefly, LNs (brachial, axillary, cervical and inguinal) and spleen were mechanically dilacerated. Cells, incubated with biotin-labeled anti-CD25 mAb (7D4, BD Biosciences), were coated with anti-biotin-microbeads (Miltenyi Biotec). The CD25⁺ cell fraction (Tregs) was obtained with two consecutive runs on magnetic cell separation LS columns (Miltenyi Biotec) or with AutoMacs, reaching 85% purity of CD25⁺ cells, >90% were Foxp3⁺. The CD25-depleted cells (Teffs) were harvested from the flow through. This fraction contained 30% CD4⁺ T cells and 0.5% residual CD25⁺ cells. For obtaining in vitro pre-activated HA₁₁₁-Teffs, the CD25⁻ fraction from TCR-HA₁₁₁ mice were stimulated in vitro for 3-4 days by CD11c⁺ splenic DC (purified using anti-

CD11c-coupled Miltentyi beads) pulsed with 10 µg/ml of HA₁₁₁ peptide in the presence of 10 ng/ml of GM-CSF (R&D systems).

Before intravenous injection, Teffs or Tregs were labeled with CFSE for 5 minutes in serum-free PBS at room temperature and were washed twice in PBS. When using freshly purified Tregs, mice received 1 x 10⁶ Tregs with or without 1 x 10⁶ Teffs (except 2 x 10⁶ cells for chimeric IL-2-deficient Teffs because of the lower proportion of HA-specific cells).

Immunization protocols in BALB/c mice. Mice were immunized the day after the transfer of HA-Tregs and HA-Teffs. For CFA immunization, mice were immunized by subcutaneous injection in the footpad of 2 µg of HA₁₂₆ peptide and/or 2 µg of HA₁₁₁ peptide emulsified in CFA. Alternatively, mice were subcutaneously immunized with DC pulsed overnight with 20 µg/ml of HA₁₂₆ peptide as previously described [1]. Cells were analyzed in the popliteal draining LN.

In vivo treatment. For blocking OX40, mice were injected ip. with 500 µg of anti-OX40-L mAb (RM134L, BioXcell) every other day from day -1 to 5 after cell transfer. For pDC depletion, mice were injected ip daily with an anti-BST2 mAb (120G8, BioXcell) at 0.2 mg from -1 to 6 in ins-HA mice and at 0.3mg from day -1 to 3 in BALB/c mice. For blocking TNF, mice were injected ip with 1mg of soluble TNFR-Fc (Etanercept, Enbrel) or iv. with 0.5 mg of anti TNFα mAb (XT3,11; BioXcell) every other day from day -1 to 5 after cell transfer. For IL-2 treatment mice were injected ip with doses daily from -1 to 3 in BALB/C mice.

Antibodies and flow cytometry analysis. The following mAbs from BD Biosciences, e-Bioscience, and Biolegend were used: PerCP- anti-CD3, allophycocyanin- PerCP- V500- labeled anti-CD4, phycoerythrin- or PerCP-labeled anti-Thy-1.1, PeCy7- or PercP-labeled anti-CD25,

allophycocyanin- labeled anti-CD11b, allophycocyanin- labeled anti-ICOS, PeCy7-labeled anti-CD11c, phycoerythrin-labeled anti-SiglecH, Alexa Fluor 700-labeled anti-CD45, Alexa Fluor 700-labeled anti-CD8, phycoerythrin-labeled anti-IL-2. The unlabeled 6.5 Ab was revealed by a biotin-labeled anti-rat IgG2b (SouthernBiotech) followed by streptavidin-allophycocyanin (BD Biosciences) staining or phycoerythrin conjugated 6.5 was used. The phycoerythrin-labeled anti-Foxp3 staining was performed using the eBioscience kit and protocol. For intracellular cytokine staining, cells were re-stimulated by HA₁₁₁-pulsed splenocytes for 6 hours in the presence of GolgiPlug (BD Biosciences). After cell surface staining, intracellular staining was performed using the CytoFix/CytoPerm kit and protocol (BD Biosciences). For intracellular cytokine staining, cells were re-stimulated by HA₁₁₁-pulsed splenocytes for 6 hours in the presence of GolgiPlug (BD Biosciences). After cell surface staining, intracellular staining was performed using the CytoFix/CytoPerm kit and protocol (BD Biosciences) Cells were acquired on a FACSCalibur or an LSRII (BD Biosciences) and analyzed with CellQuest (BD Biosciences) or FlowJo (Tree Star) software.

Immunization protocols in BALB/c mice. Mice were immunized the day after the transfer of HA-Tregs and HA-Teffs. For CFA immunization, mice were immunized by subcutaneous injection in the footpad of 2 µg of HA₁₂₆ peptide and/or 2 µg of HA₁₁₁ peptide emulsified in CFA. Alternatively, mice were subcutaneously immunized with DCs pulsed overnight with 20 µg/ml of HA₁₂₆ peptide as previously described [1]. Cells were analyzed in the popliteal draining LN.

Statistics. Statistical data were calculated using the 2-tailed unpaired Mann-witney t test. $P < 0.05$ was considered significant. For all the graphs, error bars represent SD.

Figures legends.

Figure 1. The Teff→Treg boost is OX40 dependent in ins-HA mice. Ins-HA mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ HA₁₁₁-Treg cells alone or with HA₁₁₁-Teff cells with or without blocking OX40L (a OX40-L). Cells were analyzed at day 7 in pancreatic lymph nodes (pan-LN). (a) Representative CFSE profile of donor Treg cells (CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺). (b) Absolute number of divided donor Treg cells (CFSE^{dim} CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺). (c) Representative CFSE profile of donor Teff cells (CD4⁺ 6.5⁺ Foxp3⁻). (d) Absolute number of divided donor Teff cells (CFSE^{dim} CD4⁺ 6.5⁺ Foxp3⁻). Each symbol represents an individual mouse, and bars show the means pooled from 4 independent experiments. *** $P < 0.0001$.

Figure 2. The Teff→Treg boost involves pDC in ins-HA mice. Ins-HA mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ HA₁₁₁-Treg cells alone or with HA₁₁₁-Teff cells with or without a treatment depleting pDC. Cells were analyzed at day 7 in the draining pan-LN. (a) Representative dot plot (left) and mean (right) of CD11c⁺ SiglecH⁺ cells among CD45⁺ cells (b) Representative CFSE profile of donor Treg cells (CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺). (c) Absolute number of divided donor Treg cells (CFSE^{dim} CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺ cells). (d) Representative CFSE profile of donor Teff cells (CD4⁺ 6.5⁺ FoxP3⁻). (e) Absolute number of divided donor Teff cells (CFSE^{dim} CD4⁺ 6.5⁺ Foxp3⁻). Each symbol represents an individual mouse and bars show the means from 5 independent experiments. ** $P < 0.001$; *** $P < 0.0001$.

Figure 3. A Teff→Treg boost in an inflammatory condition. BALB/c mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ HA₁₂₆-Treg cells alone or co-transferred with HA₁₁₁-Teff or HA₁₂₆-Teff cells. Then, mice were immunized with HA₁₂₆ peptide or with HA₁₂₆ + HA₁₁₁ peptides in CFA

and cells analyzed at day 4 in pop-LN. **(a)** Representative CFSE profile of donor Treg cells ($CD4^+ Thy-1.1^+ Foxp3^+$). **(b)** Absolute number of divided donor Treg cells ($CFSE^{dim} CD4^+ Thy-1.1^+ Foxp3^+$). Each symbol represents an individual mouse and bars show the means from 5 independent experiments. *** $P < 0.0001$.

Figure 4. Immune conditions required for a Teff→ Treg boost. **(a)** BALB/c mice were injected with CFSE-labeled $Thy-1.1^+ HA_{126-}$, or HA_{111-} or polyclonal-Treg cells alone or co-transferred with HA_{126-} , or HA_{111-} or polyclonal-Teff cells as indicated. Then, mice were immunized peptide emulsified in CFA or peptide-pulsed DC as indicated and donor Treg cell expansion was analyzed at day 4 in the draining pop-LN. The level of Treg cell boost (fold increase in Treg expansion) was determined by measuring the ratio of proliferating donor Treg cells ($CFSE^{dim} CD4^+ Thy1.1^+ Foxp3^+$) in mice co-transferred with Treg and Teff cells compared to mice transferred with the Treg cells alone. Data were obtained from 4 to 17 mice per group, from at least 2 independent experiments. **(b)** BALB/c mice were adoptively transferred with CFSE-labeled $Thy-1.1^+ HA_{126-}$, or HA_{111-} or polyclonal-Treg cells alone and were immunized as indicated. Representative histograms show the CFSE profile of donor Treg cells ($CD4^+ Thy1.1^+ Foxp3^+$). **(c, d)** BALB/c mice were transferred with HA_{111-} -Treg cells alone or with HA_{126-} -Teff cells and were immunized with HA_{126} and with 2, 0.02, 0.006 μg HA_{111} peptide in CFA. Representative CFSE profile of donor Treg cells ($CD4^+ Thy-1.1^+ Foxp3^+$) **(c)** and absolute number of divided donor Treg cells ($CFSE^{dim} CD4^+ Thy-1.1^+ Foxp3^+$) **(d)** in pop-LN at day 4. Each symbol represents one mouse and bars show the means from 3 independent experiments. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

Figure 5. Condition for a distal Teff→Treg boost. (a) Mice were transferred with 1×10^6 HA₁₂₆-Treg cells with or without 1×10^6 , 10×10^6 , 30×10^6 HA₁₁₁-Teff cells and immunized with CFA/HA₁₂₆ and CFA/HA₁₁₁ in the two different rear footpads. The inguinal LN (ing LN) and the pop LN, draining the site of CFA/HA₁₂₆ immunization were monitored 4 days after immunization. (b) Representative histograms show the CFSE profile of donor HA₁₂₆-Treg cells (CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺) in the pop-LN (left panel) or in the ing-LN (right panel). (c) Absolute number of divided donor Treg cells (CFSE^{dim} CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺) in the pop-LN (left panel) and ing-LN (right panel). Each symbol represents an individual mouse and bars show the means from 4 independent experiments. ** $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

Figure 6. Role of pDCs in the Teff→Treg boost in an inflammatory condition.

BALB/c mice were transferred with freshly isolated CFSE-labeled HA₁₂₆-Treg alone or co-injected with HA₁₁₁-Teffs, and immunized with CFA/HA₁₂₆₊₁₁₁ treated mice were daily injected during 4 day with 300μg mAb blocking pDC (a pDC). At day 4, mice were sacrificed, pDC depletion and transferred Tcell proliferation and expansion was analysed. Representative dot plot of CD11C⁺, SiglecH⁺ staining, gated on CD3⁺ cells in popliteal Lymph node (a) and percentage of pDC cells (b) (4 mice per group) Absolute number of divided donor Tregs (CFSE^{dim}, Thy1.1⁺, Foxp3⁺, CD4⁺) in popliteal LN 5 days after transfer (c) and fold increase of divided HA₁₂₆-Tregs are represented in (d). Absolute number of divided donor Teffs (CD4⁺, 6.5⁺) in the popliteal LN (e) (7 to 13 mice per group). Each symbol represent an individual mice and bars show the means pooled from 2 independent experiments. * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, n.s. $P > 0.1$.

Figure 7. The Teff→Treg boost in an inflammatory condition is IL-2 dependent. (a) BALB/c mice were injected with CFSE-labeled IL-2 sufficient or IL-2-deficient HA₁₁₁-Teff cells and

immunized with CFA/HA₁₁₁. Cells were analyzed at day 4 in pop-LN. Representative proportion (% \pm SD) and IL-2 production of donor Teff cells (CD4⁺ 6.5⁺ Foxp3⁻) from 3 independent experiments. The dashed line depicts the limit of IL-2⁺ cells. **(b)** BALB/c mice were injected with CFSE-labeled HA₁₂₆-Treg cells alone or co-injected with either IL-2-sufficient HA₁₁₁-Teff cells, IL-2-deficient HA₁₁₁-Teff cells, or chimeric IL-2-deficient HA₁₁₁-Teff cells. Then mice were immunized with CFA/HA₁₂₆₊₁₁₁ and cells were analyzed at day 4 in pop-LN. Absolute number of divided donor Treg cells (CFSE^{dim} CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺). Each symbol represents an individual mouse, and bars show the means pooled from at least 2 independent experiments. *** P < 0.0001; ** P < 0.001; * P < 0.01.

Figure 8. The Teff→Treg boost in an inflammatory condition is TNF dependent. BALB/c mice were injected with CFSE-labeled HA₁₂₆-Treg cells alone or co-injected with HA₁₁₁-Teff cells and immunized with CFA/HA₁₂₆₊₁₁₁. Mice were treated with or without TNFR-fc treatment and cells were analyzed at day 4 in pop-LN. **(a)** Representative CFSE profile of donor Treg cells (CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺). **(b)** Absolute number of divided donor Treg cells (CFSE^{dim} CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺). **(c)** Representative CFSE profile of donor Teff cells (CD4⁺ 6.5⁺ Foxp3⁻). **(d)** Absolute number of divided donor Teff cells (CFSE^{dim} CD4⁺ 6.5⁺ Foxp3⁻). Each symbol represents an individual mouse, and bars show the means pooled from 3 independent experiments. * P < 0.1, ** P < 0.05.

Supplementary figures legend.

Supplemental figure 1. Blocking both the OX40 and TNFR pathways are not sufficient to inhibit completely the Teff→Treg boost in ins-HA mice. Ins-HA mice were injected with CFSE-labeled Thy-1.1⁺ HA₁₁₁-Treg cells alone or with HA₁₁₁-Teff cells with or without a blocking OX40L (a OX40-L) and TNF (TNFR-Fc). Cells were analyzed at day 7 in pancreatic lymph nodes (pan-LN). Absolute number of divided donor Treg cells (CFSE^{dim} CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺). Each symbol represents an individual mouse, and bars show the means pooled from 3 independent experiments. * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$.

Supplemental figure 2. pDC depletion in the spleen. Level of pDC depletion in the spleen using the same protocol as in figure 2, evaluated by analyzing the percentage of CD11c⁺, SiglecH⁺ among CD45⁺ cells. Data were from 2 independent experiments with 4 mice per group. ** $P < 0.05$.

Supplemental figure 3. Teff cell activation and recruitment in contralateral LN. Mice were treated as described in figure 5. The inguinal LN (ing LN, left panels) and the pop-LN (right panels), draining the site of CFA/HA₁₂₆ immunization were monitored 4 days after immunization. Representative CFSE profile (upper panels) and absolute number of divided donor HA₁₁₁-Teff cells (CFSE^{dim} CD4⁺ 6.5⁺ Foxp3⁻) (upper panels). Each symbol represents an individual mouse, and bars show the means pooled from 4 independent experiments. * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

Supplemental figure 4. IL-2 treatment is not sufficient to boost Treg cells. BALB/c mice were adoptively transferred with HA₁₂₆-Treg cells alone, left unimmunized (PBS) or without immunized with CFA/HA₁₂₆ with or without IL-2 administration. At day 5 mice were euthanized, percentage of HA₁₂₆-Tregs (a), absolute number of divided HA₁₂₆-Tregs (b) in popliteal LN was shown. Cells were analyzed at day 4 in pop-LN. Absolute number of divided donor Treg cells (CFSE^{dim} CD4⁺ Thy-1.1⁺ Foxp3⁺). Each symbol represents an individual mouse, and bars show the means pooled from 2 independent experiments. ** $P < 0.05$.

Supplemental figure 5. The Teff→Treg boost in an inflammatory condition is inhibited by a anti TNF- α mAb. The experiment was exactly the same as as the one described in figure 8, except that an anti-TNF mAb was used to block TNF, instead of a TNFR-Fc reagent. Each symbol represents an individual mouse, and bars show the means. * $P < 0.1$, ** $P < 0.05$.

Bibliography

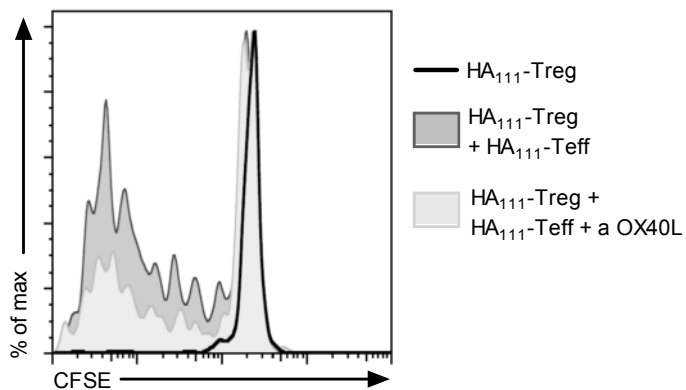
1. Billiard F, Litvinova E, Saadoun D, Djelti F, Klatzmann D, Cohen JL, Marodon G, Salomon BL: **Regulatory and effector T cell activation levels are prime determinants of in vivo immune regulation.** *J Immunol* 2006, **177**(4):2167-2174.
2. Campbell DJ, Koch MA: **Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells.** *Nature reviews Immunology* 2011, **11**(2):119-130.
3. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C: **Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes.** *Nature immunology* 2009, **10**(7):689-695.
4. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY: **Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function.** *Annual review of immunology* 2012, **30**:531-564.
5. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA: **Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells.** *J Immunol* 2006, **177**(1):192-200.
6. Cheng G, Yu A, Malek TR: **T-cell tolerance and the multi-functional role of IL-2R signaling in T-regulatory cells.** *Immunological reviews* 2011, **241**(1):63-76.
7. Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, Billiard F, Goldstein JD, Gregoire S, Martin GH, Elhage R, Derian N, Carpentier W *et al*: **Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs.** *The Journal of clinical investigation* 2010, **120**(12):4558-4568.
8. Ruby CE, Yates MA, Hirschhorn-Cymerman D, Chlebeck P, Wolchok JD, Houghton AN, Offner H, Weinberg AD: **Cutting Edge: OX40 agonists can drive regulatory T cell expansion if the cytokine milieu is right.** *J Immunol* 2009, **183**(8):4853-4857.
9. Irla M, Kupfer N, Suter T, Lissilaa R, Benkhoucha M, Skupsky J, Lalive PH, Fontana A, Reith W, Hugues S: **MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity.** *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(9):1891-1905.
10. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S: **Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization.** *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(5):723-735.
11. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I: **Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene.** *Cell* 1993, **75**(2):253-261.
12. D'Cruz LM, Klein L: **Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling.** *Nature immunology* 2005, **6**(11):1152-1159.
13. Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, Cagnard N, Carpentier W, Tang Q, Bluestone J *et al*: **IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells.** *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(9):1871-1878.
14. O'Gorman WE, Dooks H, Thorne SH, Kuswanto WF, Simonds EF, Krutzik PO, Nolan GP, Abbas AK: **The initial phase of an immune response functions to activate regulatory T cells.** *J Immunol* 2009, **183**(1):332-339.

15. Boyman O, Kovar M, Rubinstein MP, Surh CD, Sprent J: **Selective stimulation of T cell subsets with antibody-cytokine immune complexes.** *Science* 2006, **311**(5769):1924-1927.
16. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA: **Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction.** *Immunity* 2008, **28**(5):687-697.
17. Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL: **Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state.** *The Journal of experimental medicine* 2003, **198**(5):737-746.
18. Kared H, Leforban B, Montandon R, Renand A, Layseca Espinosa E, Chatenoud L, Rosenstein Y, Schneider E, Dy M, Zavala F: **Role of GM-CSF in tolerance induction by mobilized hematopoietic progenitors.** *Blood* 2008, **112**(6):2575-2578.
19. Gopisetty A, Bhattacharya P, Haddad C, Bruno JC, Jr., Vasu C, Miele L, Prabhakar BS: **OX40L/Jagged1 Cosignaling by GM-CSF-Induced Bone Marrow-Derived Dendritic Cells Is Required for the Expansion of Functional Regulatory T Cells.** *J Immunol* 2013, **190**(11):5516-5525.
20. Salomon B, Lenschow DJ, Rhee L, Ashourian N, Singh B, Sharpe A, Bluestone JA: **B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes.** *Immunity* 2000, **12**(4):431-440.
21. Zhang R, Huynh A, Whitcher G, Chang J, Maltzman JS, Turka LA: **An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs.** *The Journal of clinical investigation* 2013, **123**(2):580-593.
22. Walker LS: **Regulatory T cells overturned: the effectors fight back.** *Immunology* 2009, **126**(4):466-474.
23. Chen X, Baumel M, Mannel DN, Howard OM, Oppenheim JJ: **Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells.** *J Immunol* 2007, **179**(1):154-161.
24. Bromberg J: **TNF-alpha trips up Treg cells in rheumatoid arthritis.** *Nature medicine* 2013, **19**(3):269-270.
25. Zanin-Zhorov A, Ding Y, Kumari S, Attur M, Hippen KL, Brown M, Blazar BR, Abramson SB, Lafaille JJ, Dustin ML: **Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function.** *Science* 2010, **328**(5976):372-376.
26. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE: **TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells.** *Blood* 2006, **108**(1):253-261.
27. Dubois B, Joubert G, Gomez de Aguero M, Gouanvic M, Goubier A, Kaiserlian D: **Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in oral tolerance.** *Gastroenterology* 2009, **137**(3):1019-1028.
28. Lombardi V, Speak AO, Kerzerho J, Szely N, Akbari O: **CD8alpha(+)beta(-) and CD8alpha(+)beta(+) plasmacytoid dendritic cells induce Foxp3(+) regulatory T cells and prevent the induction of airway hyper-reactivity.** *Mucosal immunology* 2012, **5**(4):432-443.
29. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y *et al*: **Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts.** *Nature immunology* 2006, **7**(6):652-662.

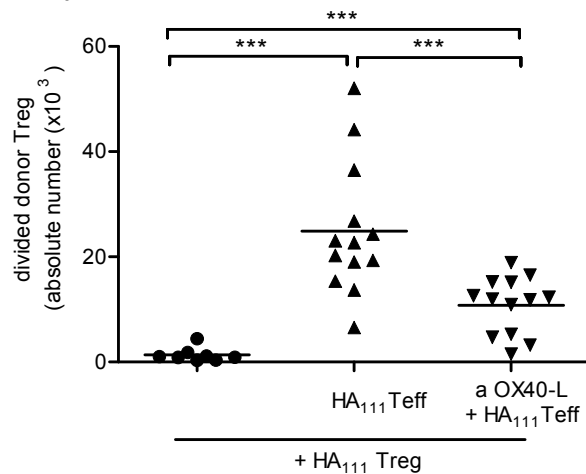
30. Ouabed A, Hubert FX, Chabannes D, Gautreau L, Heslan M, Josien R: **Differential control of T regulatory cell proliferation and suppressive activity by mature plasmacytoid versus conventional spleen dendritic cells.** *J Immunol* 2008, **180**(9):5862-5870.
31. Conrad C, Gregorio J, Wang YH, Ito T, Meller S, Hanabuchi S, Anderson S, Atkinson N, Ramirez PT, Liu YJ *et al*: **Plasmacytoid dendritic cells promote immunosuppression in ovarian cancer via ICOS costimulation of Foxp3(+) T-regulatory cells.** *Cancer research* 2012, **72**(20):5240-5249.
32. Faget J, Bendriss-Vermare N, Gobert M, Durand I, Olive D, Biota C, Bachelot T, Treilleux I, Goddard-Leon S, Lavergne E *et al*: **ICOS-ligand expression on plasmacytoid dendritic cells supports breast cancer progression by promoting the accumulation of immunosuppressive CD4+ T cells.** *Cancer research* 2012, **72**(23):6130-6141.
33. Lo D, Freedman J, Hesse S, Palmiter RD, Brinster RL, Sherman LA: **Peripheral tolerance to an islet cell-specific hemagglutinin transgene affects both CD4+ and CD8+ T cells.** *Eur J Immunol* 1992, **22**(4):1013-1022.
34. Scott B, Liblau R, Degermann S, Marconi LA, Ogata L, Caton AJ, McDevitt HO, Lo D: **A role for non-MHC genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity.** *Immunity* 1994, **1**(1):73-83.
35. Kirberg J, Baron A, Jakob S, Rolink A, Karjalainen K, von Boehmer H: **Thymic selection of CD8+ single positive cells with a class II major histocompatibility complex-restricted receptor.** *The Journal of experimental medicine* 1994, **180**(1):25-34.
36. Schorle H, Holtschke T, Hunig T, Schimpl A, Horak I: **Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting.** *Nature* 1991, **352**(6336):621-624.
37. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL: **CD4(+)CD25(+) Immunoregulatory T Cells: New Therapeutics for Graft-Versus-Host Disease.** *J Exp Med* 2002, **196**(3):401-406.

Figure 1.

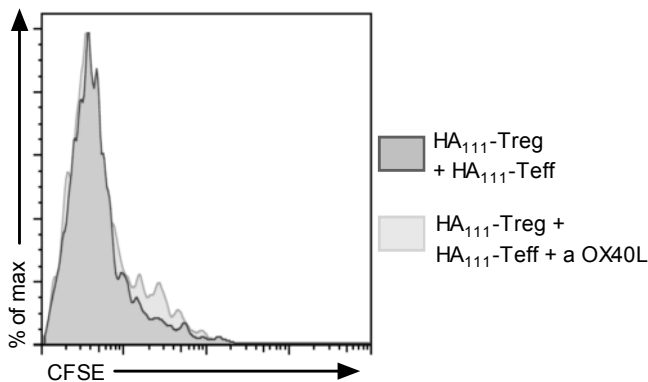
a



b



c



d

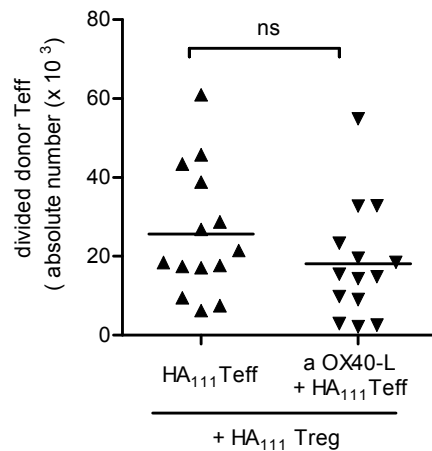


Figure 2

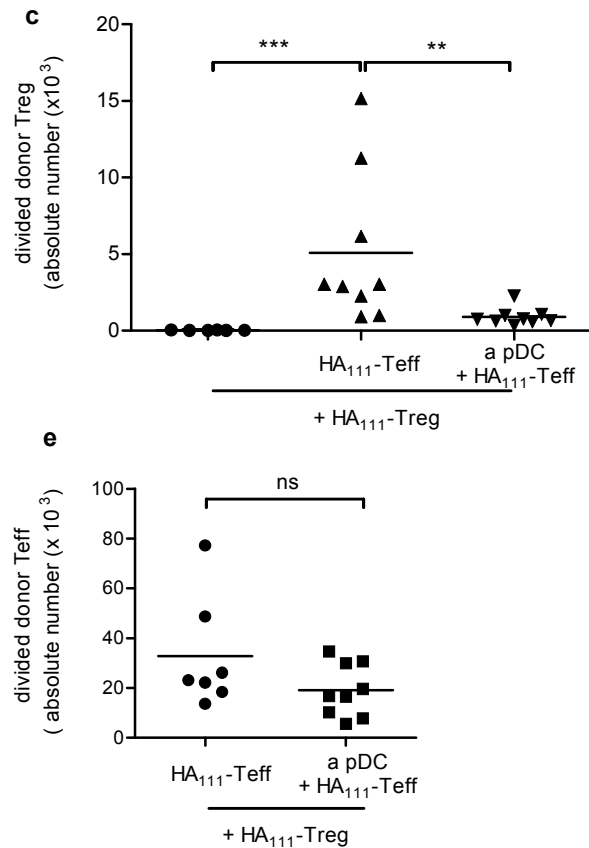
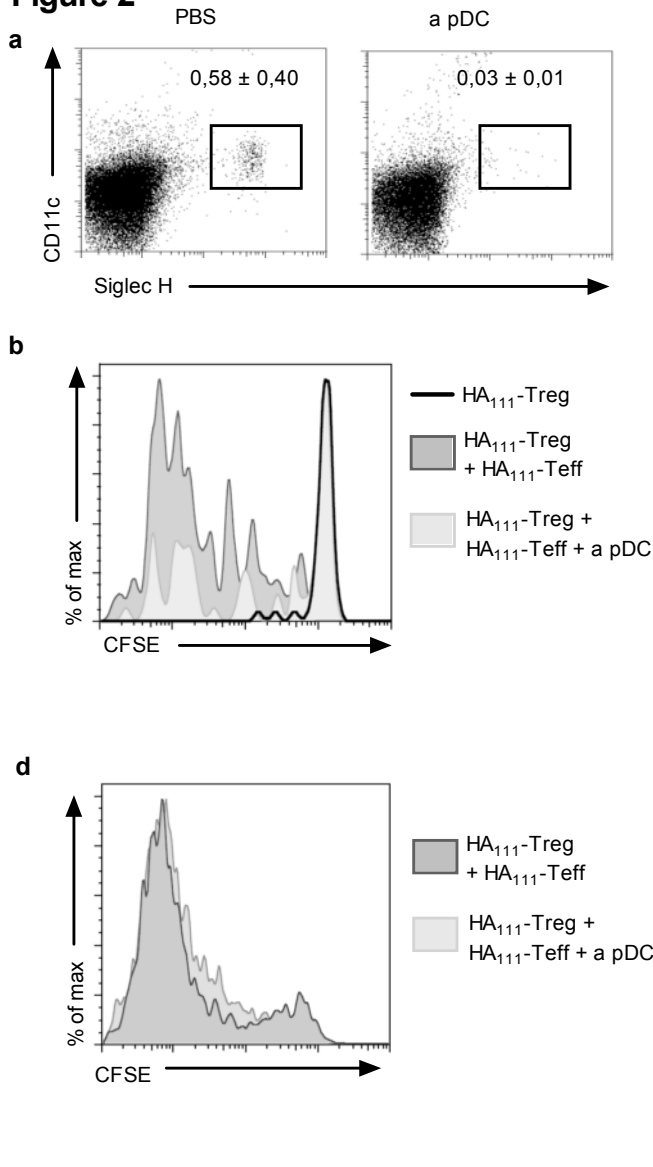
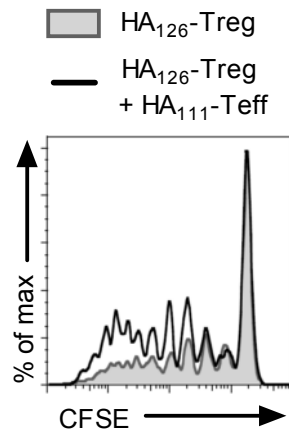


Figure 3

a



b

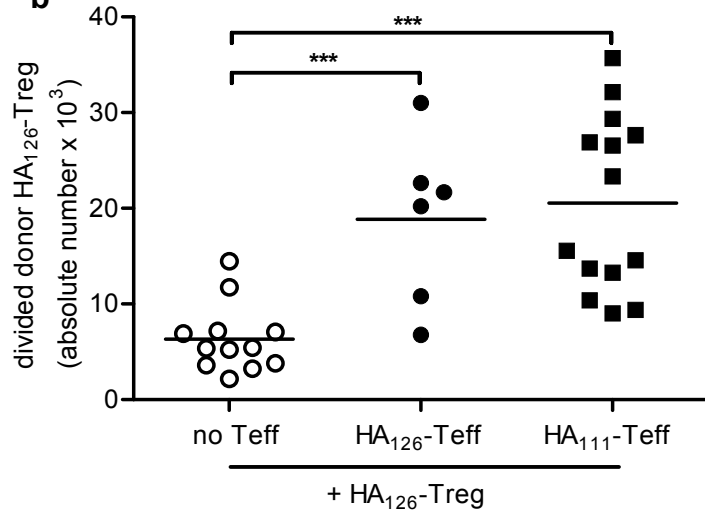


Figure 4.

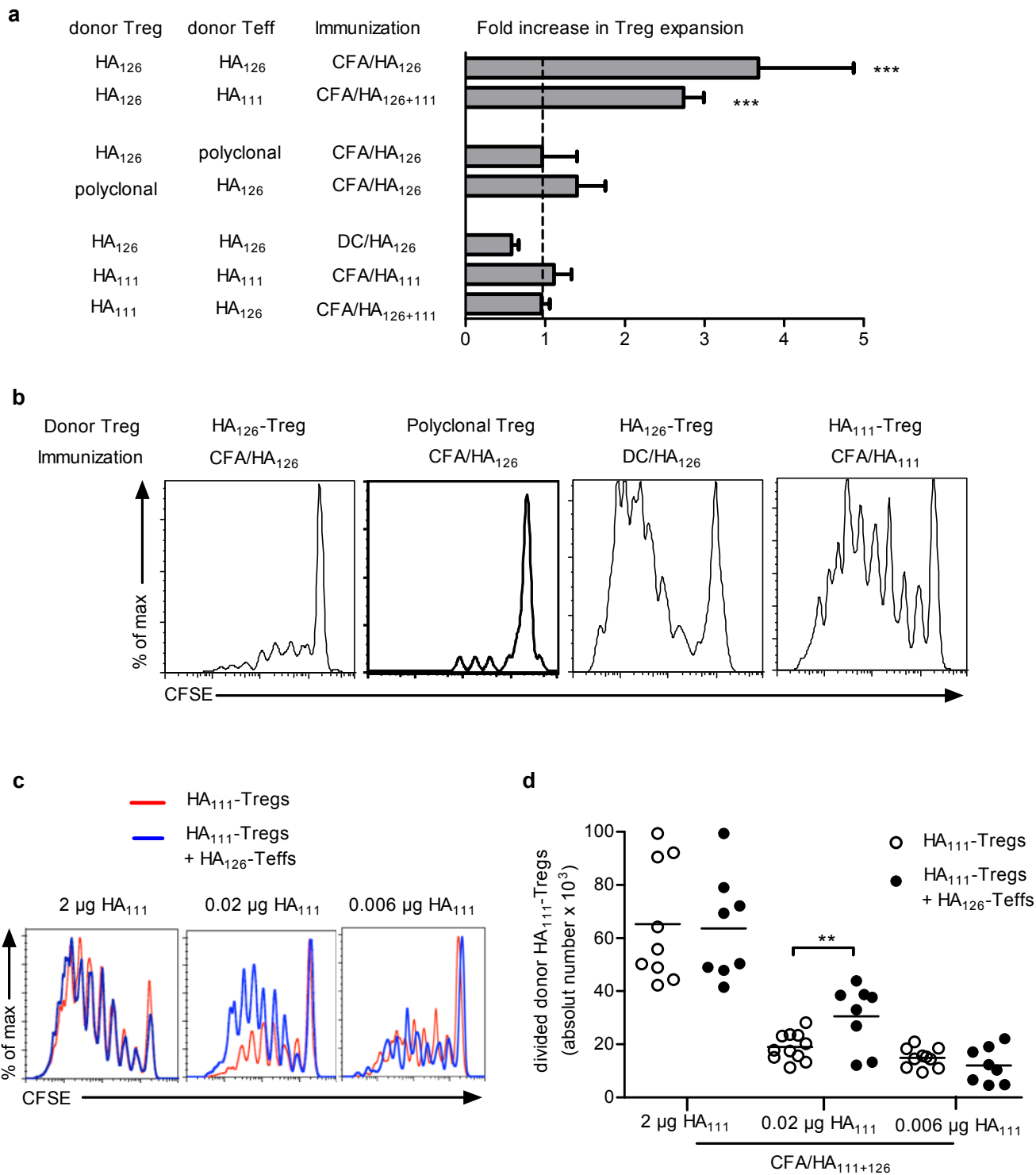
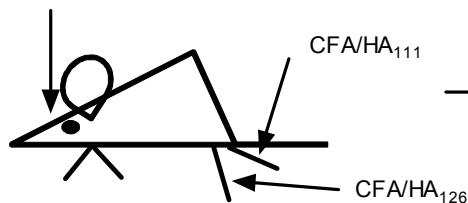


Figure 5.

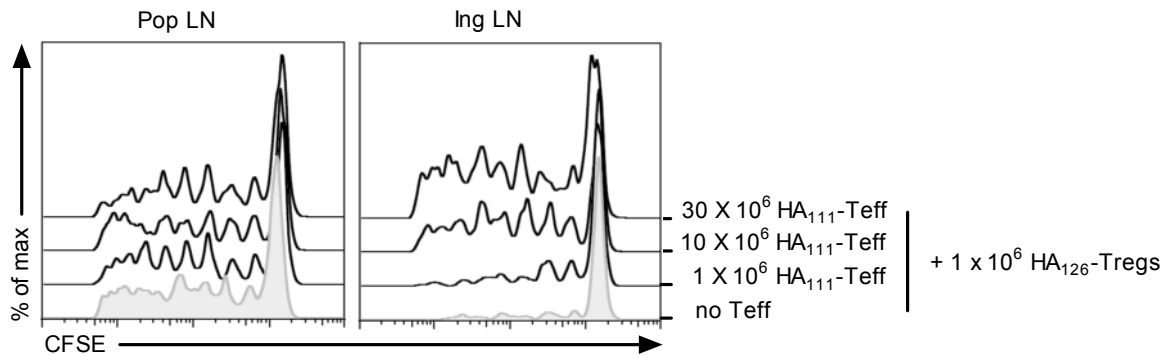
a

HA₁₂₆-Treg alone
or with HA₁₁₁-Teff



analysis of HA₁₂₆-Treg in
CFA/HA₁₂₆ popliteal LN or
in inguinal LN

b



c

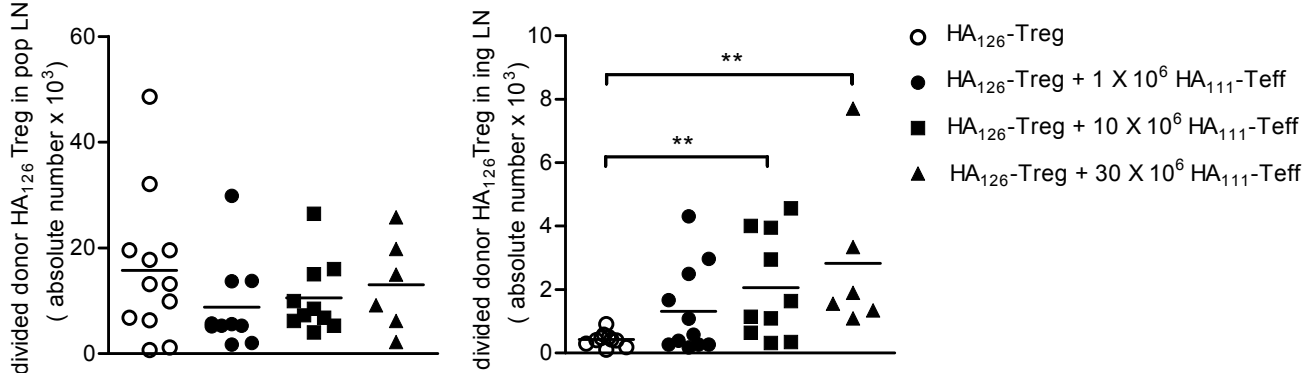


Figure 6.

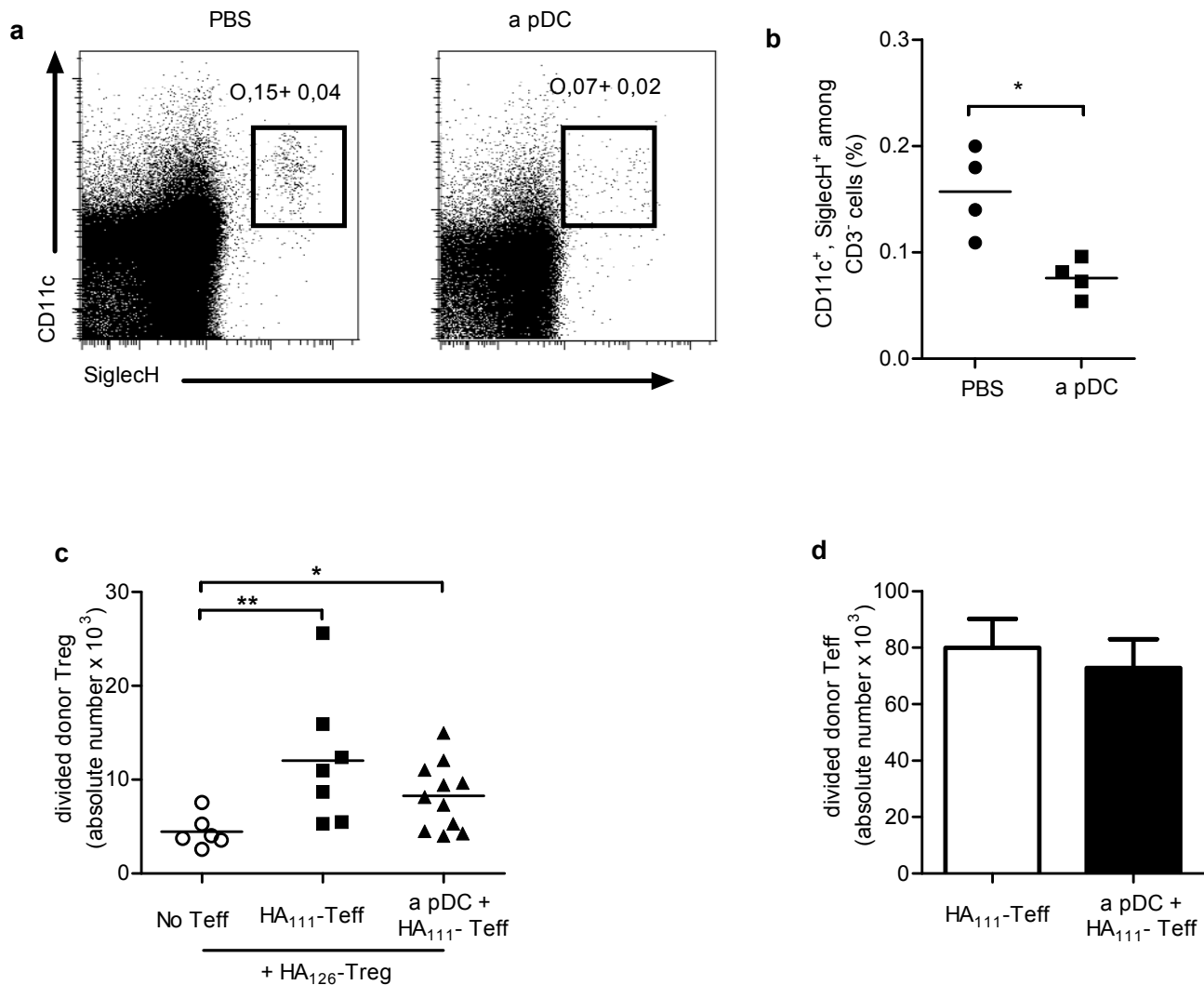
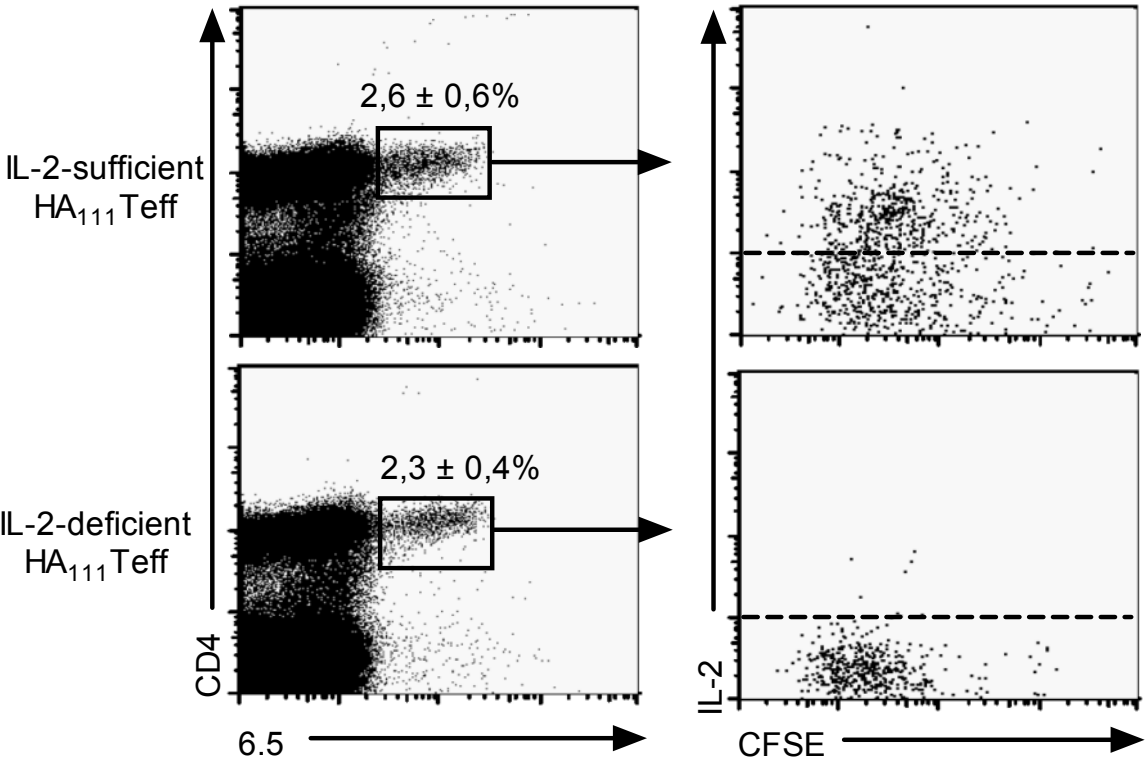


Figure 7.

a



b

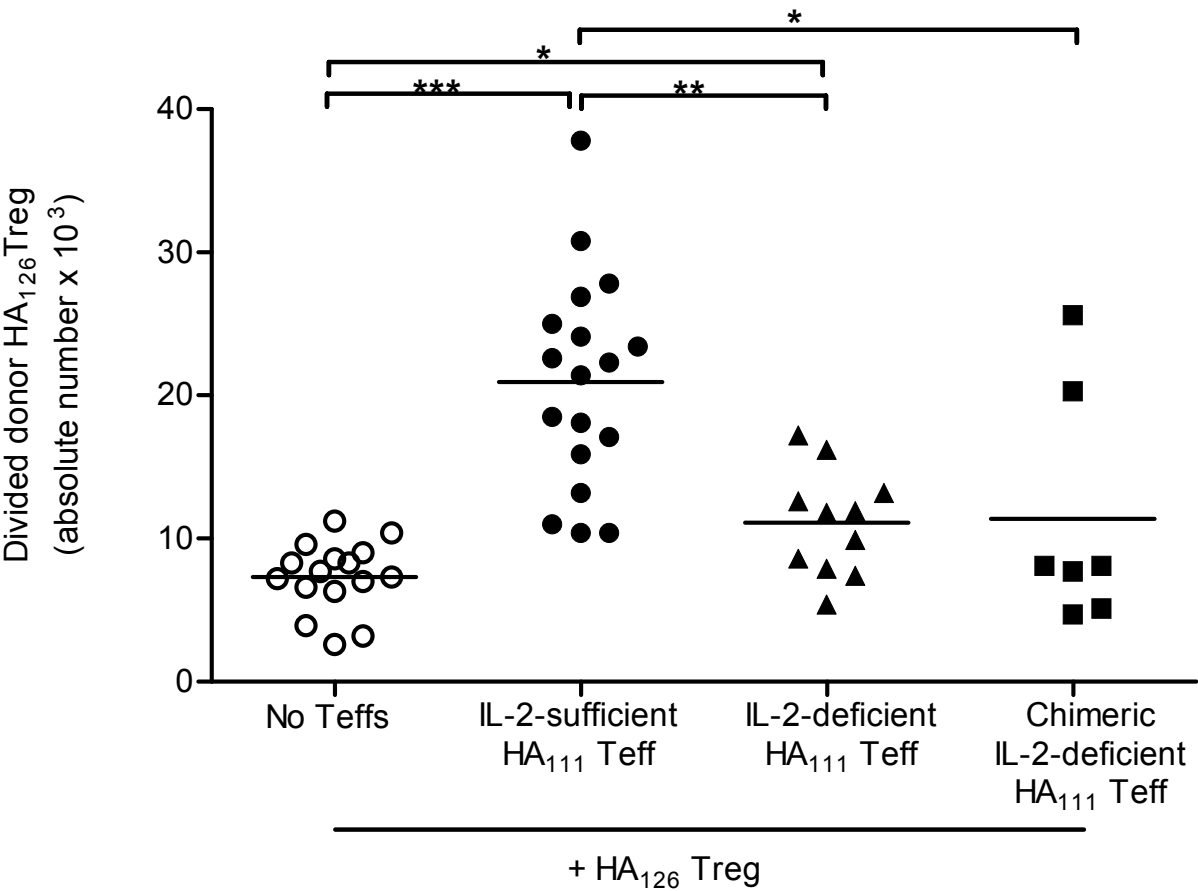
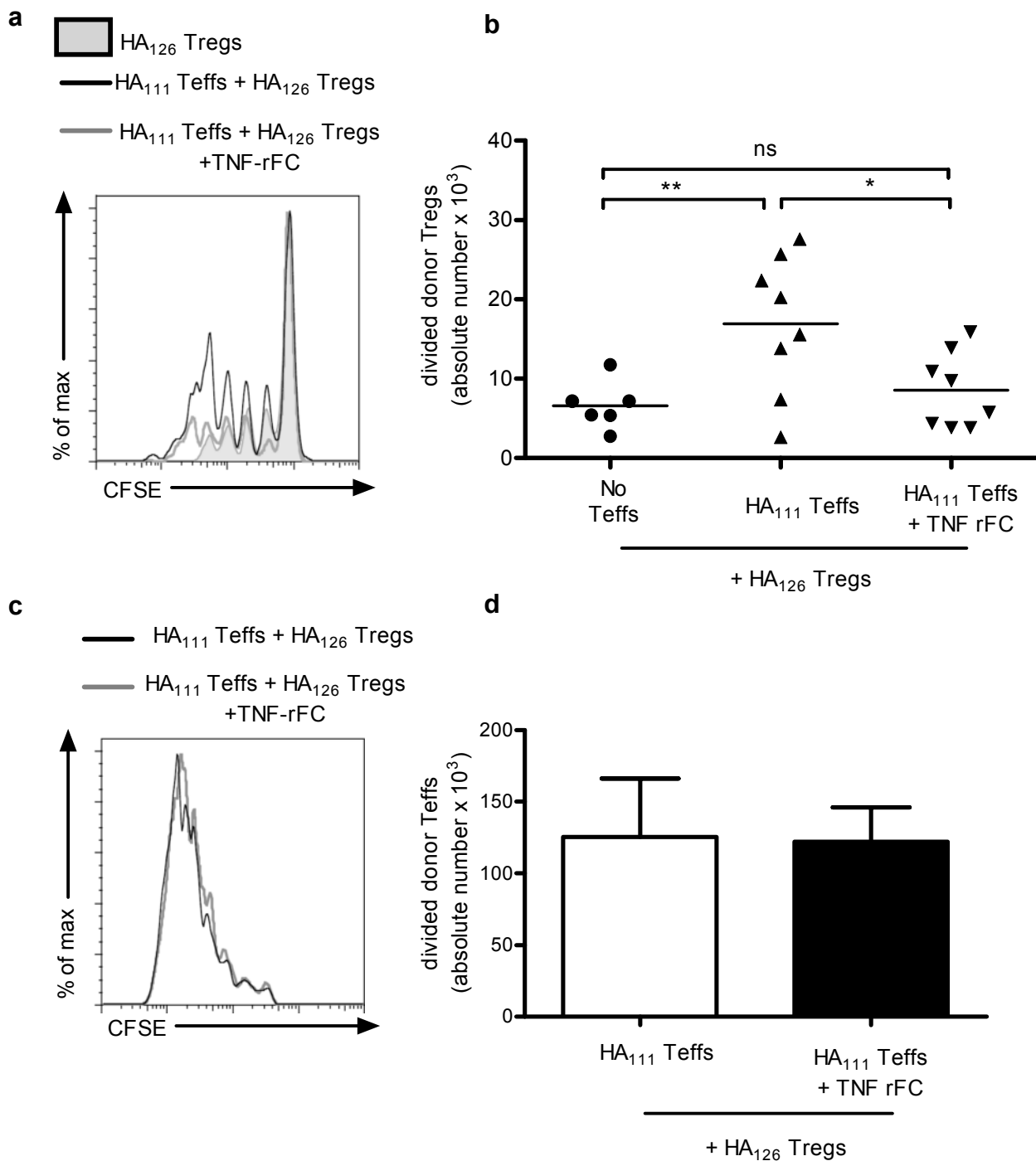
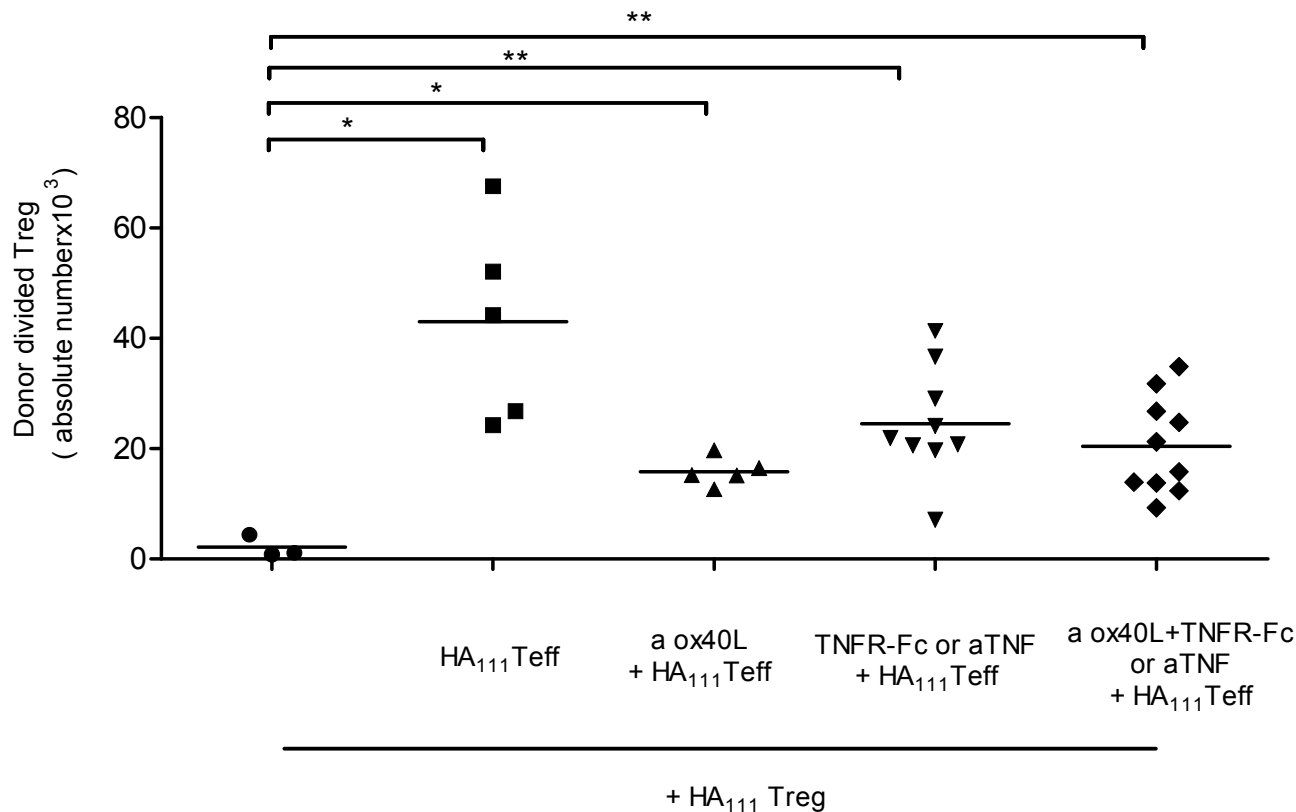


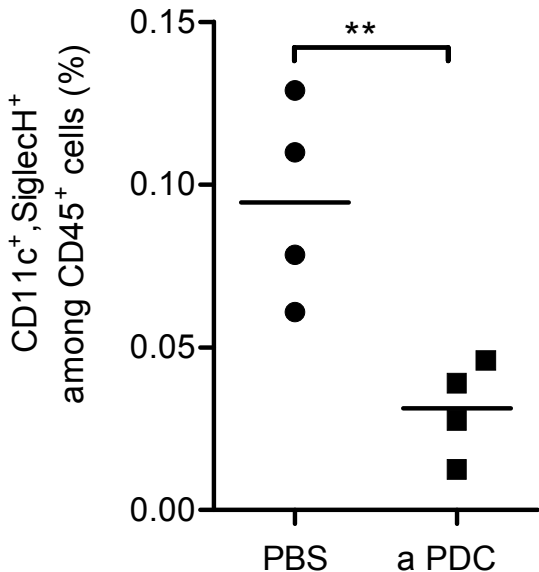
Figure 8



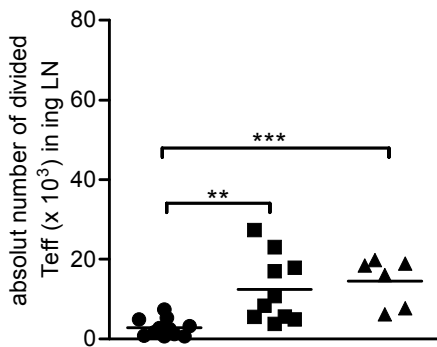
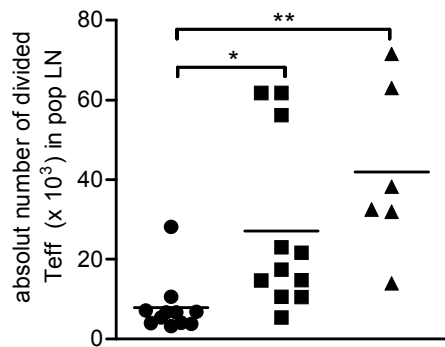
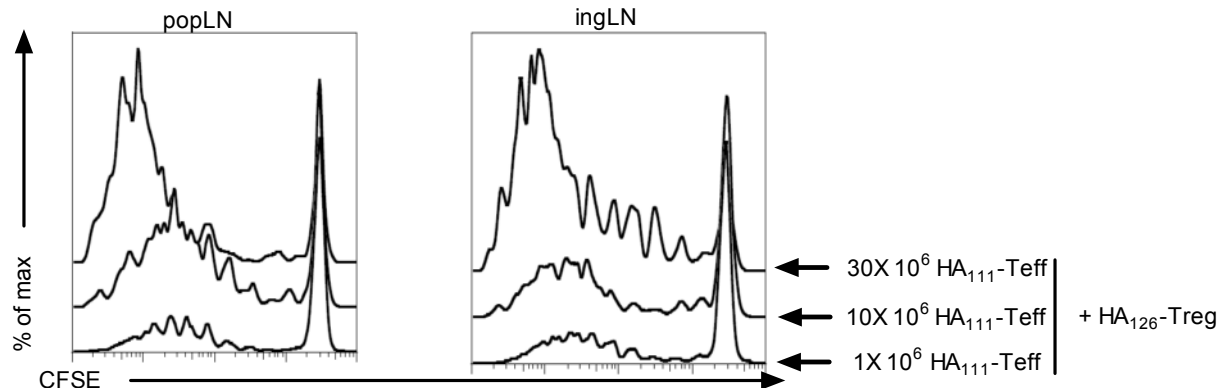
Supplementary Figure 1.



Supplementary Figure 2.

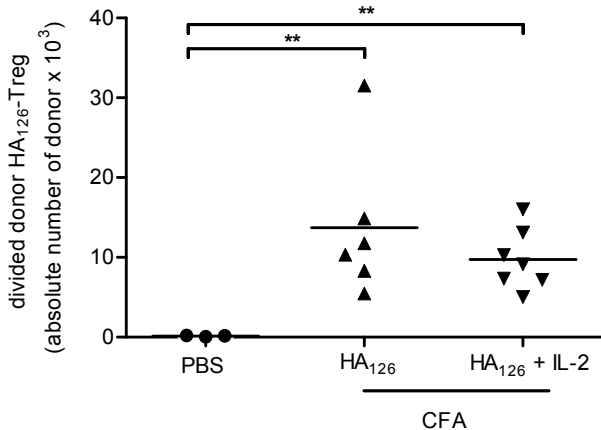


supplementary Figure 3.

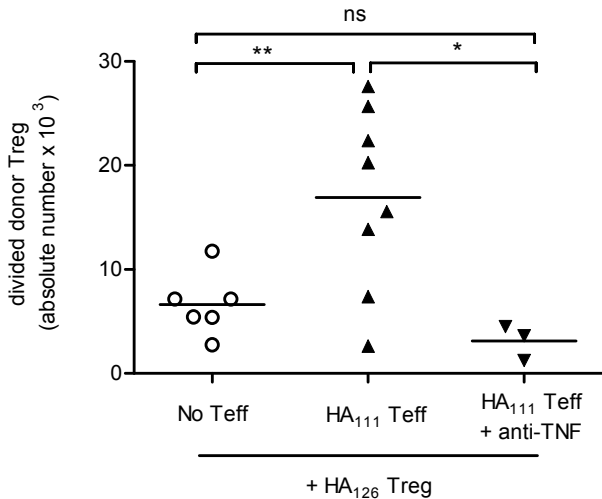


- ▲ HA₁₂₆-Treg + 30X 10^6 HA₁₁₁-Teff
- HA₁₂₆-Treg + 10X 10^6 HA₁₁₁-Teff
- HA₁₂₆-Treg + 1X 10^6 HA₁₁₁-Teff

supplementary figure 4



Supplementary Figure 5.



IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells

Yenkel Grinberg-Bleyer,^{1,2,3} Audrey Baeyens,^{1,2,3} Sylvaine You,⁴ Rima Elhage,^{1,2,3} Gwladys Fourcade,^{1,2,3} Sylvie Gregoire,^{1,2,3} Nicolas Cagnard,⁵ Wassila Carpentier,⁶ Qizhi Tang,⁷ Jeffrey Bluestone,⁷ Lucienne Chatenoud,⁴ David Klatzmann,^{1,2,3,8} Benoît L. Salomon,^{1,2,3} and Eliane Piaggio^{1,2,3}

¹Université Pierre et Marie Curie Univ Paris 06, ²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7211, and ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3), 75013 Paris, France

⁴INSERM U580 and ⁵Bioinformatics Platform, Faculty of Medicine Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, 75015 Paris, France

⁶Plate-forme Post-Génomique P3S, UPMC Univ Paris 6, Faculty of Medicine, 75013 Paris, France

⁷Diabetes Center and the Department of Medicine, University of California, San Francisco, San Francisco, CA 94143

⁸Department of Biotherapies, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 75013 Paris, France

Regulatory T cells (T reg cells) play a major role in controlling the pathogenic autoimmune process in type 1 diabetes (T1D). Interleukin 2 (IL-2), a cytokine which promotes T reg cell survival and function, may thus have therapeutic efficacy in T1D. We show that 5 d of low-dose IL-2 administration starting at the time of T1D onset can reverse established disease in NOD (nonobese diabetic) mice, with long-lasting effects. Low-dose IL-2 increases the number of T reg cells in the pancreas and induces expression of T reg cell-associated proteins including Foxp3, CD25, CTLA-4, ICOS (inducible T cell costimulator), and GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor) in these cells. Treatment also suppresses interferon γ production by pancreas-infiltrating T cells. Transcriptome analyses show that low-dose IL-2 exerts much greater influence on gene expression of T reg cells than effector T cells (T eff cells), suggesting that nonspecific activation of pathogenic T eff cells is less likely. We provide the first preclinical data showing that low-dose IL-2 can reverse established T1D, suggesting that this treatment merits evaluation in patients with T1D.

CORRESPONDENCE

Eliane Piaggio:
elianepiaggio@yahoo.com

Abbreviations used: GITR, glucocorticoid-induced TNF receptor; ICOS, inducible T cell costimulator; NOD, nonobese diabetic; PLN, pancreatic LN; T1D, type 1 diabetes; T eff cell, effector T cell; T reg cell, regulatory T cell.

In type 1 diabetes (T1D), the immune system destroys the insulin-producing β cells of the pancreas. The conventional treatment, consisting of life-long daily and multiple insulin injection only imperfectly prevents severe hypoglycemia and vascular complications. Thus, there is a clear need for improved treatments of T1D. At clinical diabetes onset, residual β cells still produce insulin, offering a window for therapeutic intervention to stop the autoimmune destruction and rescue β cell function. Extensive research and clinical studies are being developed in this direction (Chatenoud and Bluestone, 2007).

Even though the etiology and pathogenesis of human T1D are still poorly known, major paradigms of its physiopathology have been established from studies in the nonobese diabetic

(NOD) mice. We and others have shown that the CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (T reg cells) play a major role in the control of T1D (Salomon et al., 2000; Sakaguchi et al., 2006). Moreover, injecting islet-specific T reg cells can reverse established diabetes in NOD mice (Tang et al., 2004). However, at present the lack of good manufacture practice procedures to obtain antigen-specific T reg cells precludes the translation of such approach to the clinic. Stimulating the patient's own T reg cell compartment to down-regulate the autoimmune process represents a more accessible alternative.

IL-2 was identified 30 yr ago for its strong capacity to stimulate T cells in vitro. Therefore, it has been used in the clinic for boosting the

Y. Grinberg-Bleyer and A. Baeyens contributed equally to this paper.

B.L. Salomon and E. Piaggio contributed equally to this paper.

© 2010 Grinberg-Bleyer et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

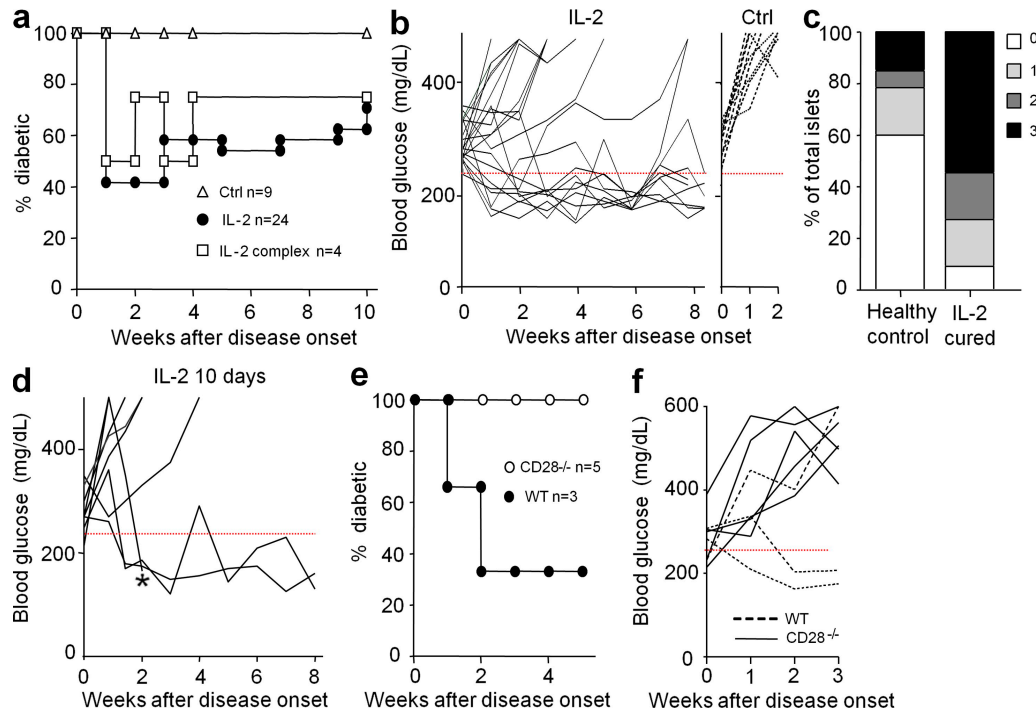


Figure 1. Diabetes remission by IL-2 therapy. (a and b) Spontaneous new-onset diabetic NOD mice (two consecutive blood glucose concentrations between 250 and 350 mg/dl) were treated for 5 d with PBS or denatured IL-2 (Ctrl), 25,000 IU IL-2 (IL-2), or 0.5 μ g IL-2 + 5 μ g anti-IL-2 (IL-2 complex). Blood glucose concentrations were monitored. (a) Percentage of diabetic mice. (b) Blood glucose concentrations in IL-2-treated (left) or control (right) mice. The 250 mg/dl blood glucose value is indicated by a dashed red line. Age at treatment onset was 26 ± 9.4 wk in mice that did not revert and 24 ± 7.6 wk in the cured ones. (c) Intra-islet infiltration in IL-2-treated mice that remain free of overt diabetes 12–35 wk after treatment (IL-2 cured) and diabetes-free age-matched controls (healthy controls) was evaluated histologically. The graph shows the percentage of islets with no infiltration (0), peri-insulinitis (1), moderate insulinitis with <50% islet area infiltrated (2), and severe insulinitis with >50% islet area infiltrated (3). Data for the control group represent 60 islets from four mice, and for the IL-2-treated group represent 22 islets from three mice. (d) Blood glucose concentrations in new onset diabetic mice that had not reverted after 5 d of IL-2 treatment and were further treated for 5 more days. Age at treatment onset was 22 ± 4.5 wk in mice that did not revert and 22 ± 9.2 in the cured ones. * indicates a mouse that was sacrificed for analysis. (e and f) New onset diabetic CD28^{-/-} or WT littermate NOD mice were treated for 5 d with 25,000 IU IL-2 and blood glucose concentrations were monitored. (e) Percentage of diabetic mice. (f) Blood glucose concentrations.

immune response in certain cancers and infectious diseases (Zhang et al., 2005; Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006). However, the results were often disappointing (Zhang et al., 2005). The unexpected and severe T cell-mediated autoimmune syndrome of IL-2-deficient mice showed the complex role of this cytokine in the immune system (Sadlack et al., 1993). These findings were then explained by the critical role of IL-2 on the peripheral survival and suppressive function of T reg cells (Papiernik et al., 1998). Consistent with this, IL-2 administration has been shown to expand and activate T reg cells in humans and mice (Zhang et al., 2005; Ahmadzadeh and Rosenberg, 2006). Thus, although IL-2 has pleiotropic functions, its major impact is to favor T reg cell activity (Malek, 2008). Besides, NOD mice present a qualitative diminution of IL-2 production (Yamanouchi et al., 2007), and a genetic predisposing factor to T1D development in humans and NOD mice is linked to IL-2/IL-2R gene polymorphisms (Vella et al., 2005).

We have recently reported that insufficient IL-2 amounts in the pancreas are responsible for poor T reg cell survival in this tissue, which could lead to progressive breakdown of self-tolerance and development of diabetes in NOD mice (Tang

et al., 2008). We and others also showed that young prediabetic NOD mice treated with low-dose IL-2 alone, or together with rapamycin, can be protected from the development of disease (Serreze et al., 1989; Rabinovitch et al., 2002; Tang, et al., 2008). However, although >200 different treatments can prevent T1D in NOD mice, only very few are effective to cure established disease (Shoda et al., 2005). In this paper, we show that only 5-d administration of low-dose IL-2 at diabetes onset can induce long-lasting remission in the treated animals. IL-2 did not stimulate the diabetogenic effector T cells (T eff cells) but rather specifically stimulated CD4⁺Foxp3⁺ T reg cells in the pancreas to dampen the inflammatory milieu. Thus, in the presence of pathogenic T cells, IL-2 at a low dose is a selective T reg cell stimulator endowed with a great therapeutic potential.

RESULTS AND DISCUSSION

Short-term administration of low-dose IL-2 induces long-lasting diabetes remission in NOD mice but is inefficient in T reg cell-deficient mice

We assessed if 5 d of low-dose IL-2 administration could be effective to cure clinical diabetes in NOD mice. Remarkably,

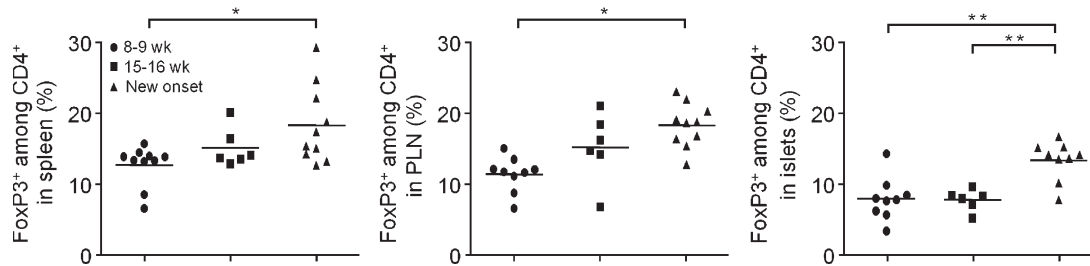


Figure 2. The proportion of T reg cells increases with age and disease in lymphoid tissues and in the pancreas of NOD mice. The percentage of Foxp3⁺ cells among CD4⁺ cells in the spleen, PLN, and pancreas of untreated nondiabetic NOD mice of different ages and recent onset diabetic NOD mice (new onset) was quantified by FACS. Graphs show cumulative individual and mean (horizontal bars) data from two to five independent experiments. Each symbol represents an individual mouse. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$. The percentage of T reg cells in the pancreas at 8–9 wk is significantly different from the percentage of T reg cells in the PLN ($P < 0.05$) and spleen ($P < 0.05$) of mice of the same age. The percentage of T reg cells in the pancreas at 15–16 wk is significantly different from the percentage of T reg cells in the PLN ($P < 0.01$) and spleen ($P < 0.001$) of mice of the same age.

this treatment induced diabetes remission in 60% of the mice within 1 wk, and most of them remained normoglycemic over the 10-wk duration of the experiment (Fig. 1, a and b). Five mice were followed up for 30–50 wk after treatment and were still diabetes free (unpublished data). Administration of an IL-2/anti-IL-2 mAb complex, which induces a more dramatic T reg cell expansion than IL-2 alone (Tang et al., 2008), provided a similar but not better curative effect. Histological examination of mice that remained diabetes free for 12–35 wk after IL-2 treatment showed that pancreatic islets were more infiltrated than age-matched nondiabetic controls, indicating that the treatment did not induce a long-lasting clearance of insulinitis (Fig. 1 c). We tried to optimize treatment efficacy by prolonging IL-2 administration or by combining IL-2 with drugs that are favorable for T reg cells, such as rapamycin, glucocorticoids, and α -CD3 (Battaglia et al., 2005; Chen et al., 2006; Chatenoud and Bluestone, 2007). Prolonging IL-2 administration from 5 to 10 d induced disease remission in three out of eight mice that had not reverted after 5 d (Fig. 1 d). The other treatments did not show obvious improved outcome (unpublished data).

Our previous results indicated that disease prevention by the IL-2/anti-IL-2 mAb complex was associated with increased T reg cell survival in the pancreas (Tang et al., 2008). To address the role of T reg cells in IL-2 remission of overt diabetes, we repeated the treatment in CD28 KO NOD mice, which have a profound deficit in T reg cells (Salomon et al., 2000). IL-2 administration did not reverse hyperglycemia in CD28 KO mice, whereas diabetes remission was observed in two out of three WT littermates (Fig. 1, e and f), suggesting that low-dose IL-2 therapy is inefficient in the absence of natural T reg cells. Overall, our results show, for the first time, that low-dose IL-2 administration is one of the few treatments that can cure spontaneous overt diabetes in NOD mice (Shoda et al., 2005).

Short-term administration of low-dose IL-2 does not modify the peripheral homeostasis of hematopoietic cells

Given that T reg cells are not the only cells sensitive to IL-2 and that a systemic IL-2-mediated activation of T reg cells could lead to detrimental global immunosuppression, we performed a comprehensive analysis of the effect of IL-2 administration on

the different hematopoietic subpopulations potentially sensitive to IL-2 in the spleen and pancreatic LN (PLN). Prediabetic (8–14 wk old) NOD mice were treated for 5 d with 25,000 IU (the low dose mentioned in the Introduction) or 250,000 IU IL-2. No significant change was observed at low-dose IL-2 on the total cell number, the proportion of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺Foxp3⁺, CD8⁺Foxp3⁺, NK, B, and CD11b⁺ cells (Table S1), or their activation status (unchanged CD44 expression; unpublished data). Also, the proportions of the different dendritic cell subpopulations remained unchanged (unpublished data). Only when high-dose IL-2 was used was cell homeostasis modified, with a significant increase of the cell numbers in PLN and the proportion of CD4⁺Foxp3⁺, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, and CD8⁺Foxp3⁺ populations in the spleen. These data indicated that 5 d of low-dose IL-2 administration did not modify steady-state homeostasis of hematopoietic cells in lymphoid organs. In contrast, we have previously reported that low-dose administration of the IL-2/anti-IL-2 complex favored the expansion of T reg, T eff, NK, and CD8⁺ T cells in lymphoid tissues leading to a possible undesired systemic response (Tang et al., 2008). We thus focused on the mechanism of action of low-dose plain IL-2 for the rest of our study.

Low-dose IL-2 shows a profound and specific effect on pancreatic T reg cells

Data suggest that T reg cells present in the pancreas control the progression to destructive insulinitis in prediabetic mice (Feuerer et al., 2009). However, under highly inflammatory conditions, reduced survival or insufficient function of T reg cells may unleash T eff cell autoimmune attack (Tang et al., 2008). To establish whether the IL-2 curative effect was related to a modification of T reg cell numbers and/or characteristics in the pancreas, we quantified their proportion in the spleen, PLN, and pancreas of 8–9- and 15–16-wk-old prediabetic and new onset diabetic NOD mice. The proportion of T reg cells gradually increased with age and disease evolution in the spleen, PLN, and islets (Fig. 2). Unexpectedly, in prediabetic mice (8–16 wk old), significantly lower proportions of T reg cells (8% of CD4⁺ T cells) were found in the pancreas compared with normal ratios (10–15% of CD4⁺ T cells) in the spleen and PLN (Fig. 2 legend,

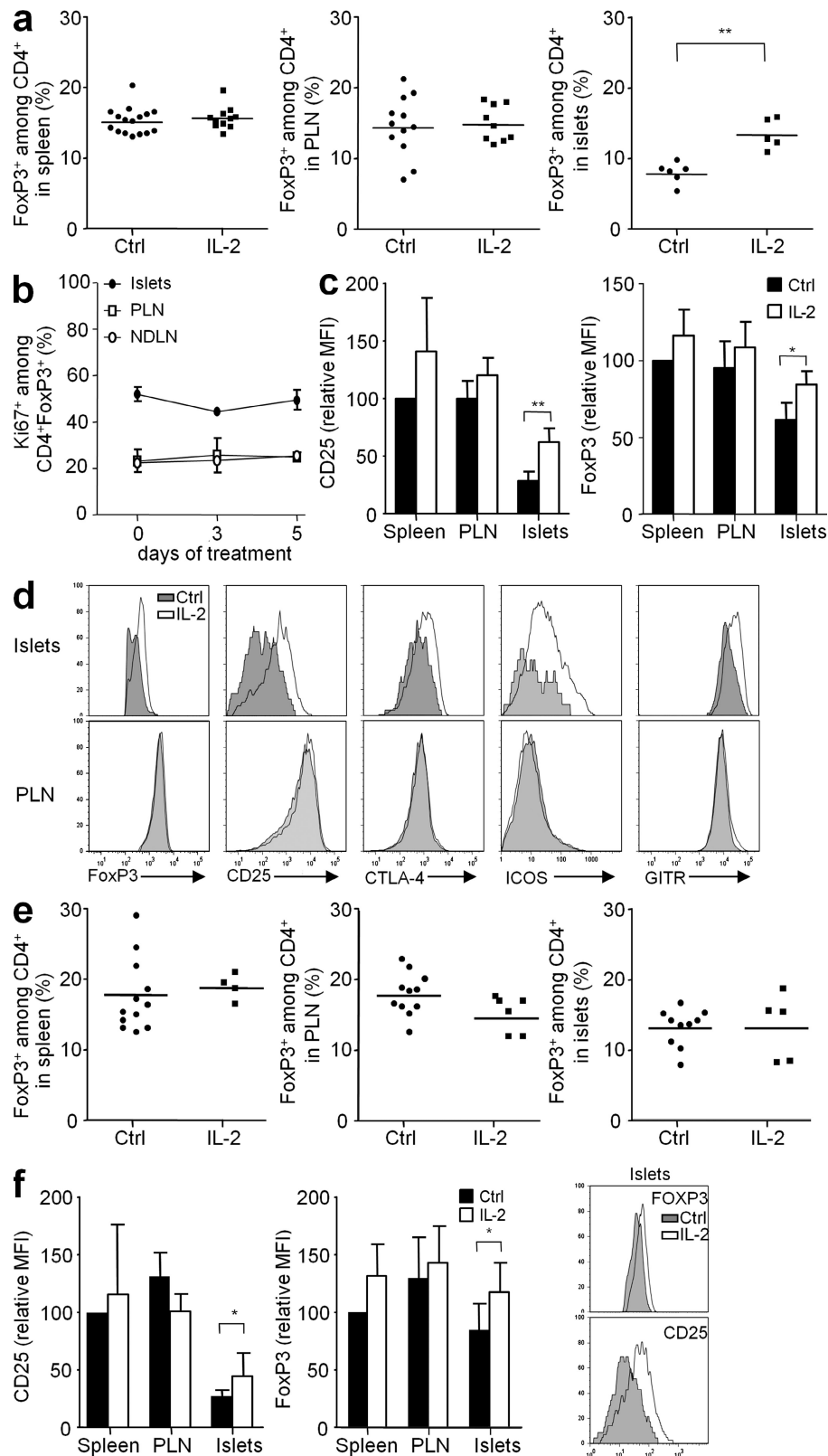


Figure 3. IL-2 treatment increases T reg cell proportions and reinforces the T reg cell phenotype specifically in inflamed pancreas. Prediabetic (a, c, and d) or new onset diabetic (e and f) NOD mice received five daily injections of PBS (Ctrl) or 25,000 IU IL-2 and were sacrificed 2 h after the last injection. (a and e) The percentage of Foxp3⁺ cells among CD4⁺ cells was determined by FACS in the spleen, PLN, and pancreas. Symbols represent individual mice and horizontal bars are the means. (b) Percentage of Ki67⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁺ cells from islets, PLN, and nondraining LN (NDLN) of prediabetic mice untreated (day 0)

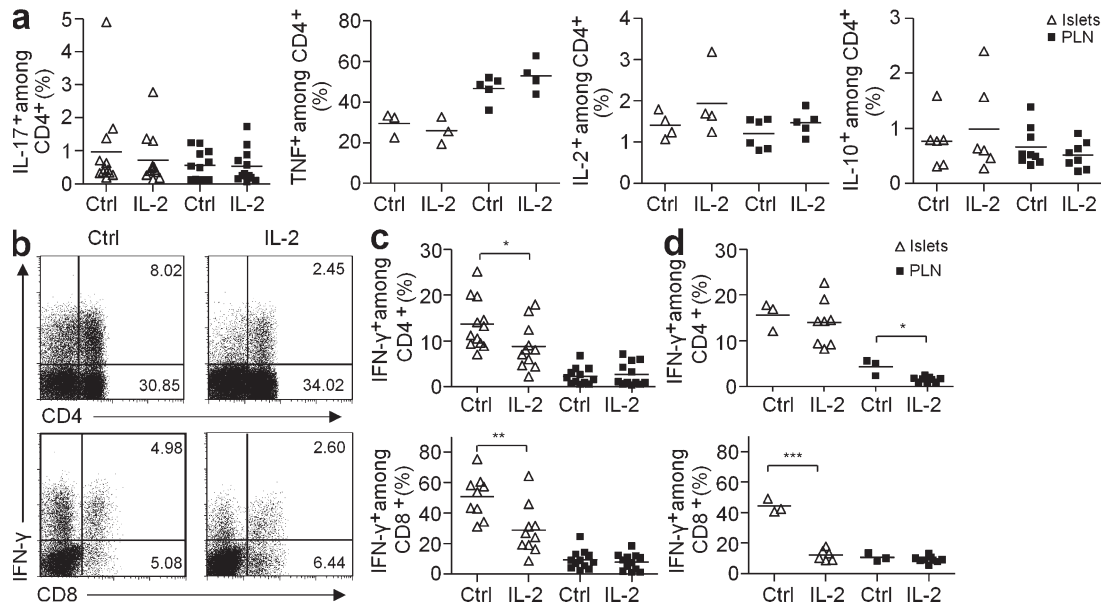


Figure 4. IL-2 treatment induces a decrease in IFN- γ production by pancreas-infiltrating T cells. Cytokine production by CD4⁺ and CD8⁺ T cells from pancreas and PLN of NOD mice, treated as in Fig. 3, was quantified after ex vivo restimulation with PMA-ionomycin. (a) Percentage of CD4⁺ producing IL-10, IL-2, TNF, or IL-17 in control or IL-2-treated prediabetic NOD mice. Data cumulate two to three independent experiments. (b) Representative dot plot of IFN- γ production in CD4⁺ (top) and CD8⁺ (bottom) T cells in the pancreas of prediabetic mice treated or not with IL-2. Numbers in quadrants indicate percentage of cells. (c and d) Percentage of IFN- γ ⁺ CD4⁺ (top) and CD8⁺ (bottom) T cells in islets and PLN of prediabetic (c) and new-onset diabetic (d) NOD mice. Data cumulate five and three experiments, respectively. Symbols represent individual mice and horizontal bars are the means. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$.

p-values). At disease onset, the percentage of pancreatic T reg cell was significantly increased to reach 14% of CD4⁺ T cells. A similar increase in the proportion of T reg cell in PLN with aging has been reported (Mellanby et al., 2007). However, in this same study, T reg cell proportions were unchanged between nondiabetic and recent-onset diabetic mice, which is at odds with our results. This could be a result of variations between different NOD mice colonies or of the technique used to purify islet-infiltrating T cells. Our results confirm and complete our previous and paradoxical observation that T reg cells increase with age and disease development but not sufficiently to control autoimmunity (Tang et al., 2008). Also, we show for the first time that over time, consistently lower proportions of T reg cell are found in the pancreas compared with lymphoid tissues.

We then studied the IL-2 effect on the inflammatory pancreatic infiltrate of late prediabetic mice (14–19 wk old). After 5 d of low-dose IL-2 administration, the proportion of T reg cells increased 1.7-fold in the pancreas of prediabetic mice, reaching similar proportions to those in the spleen and PLN, where T reg cell proportions were unchanged (Fig. 3 a). This increase was not associated with augmented T reg cell division, as the percentage of cycling cells, determined by the expression of Ki67

(Fig. 3 b) and EdU incorporation (not depicted), was unaffected during IL-2 treatment. T reg cell division in LN was also unaffected by IL-2 treatment (Fig. 3 b). We also verified that T eff cell cycling was not modified under IL-2 treatment (Fig. S1 a). The increase in the numbers of pancreatic T reg cells induced by IL-2 is most probably the result of an improvement of T reg cell survival (Tang et al., 2008) or, alternatively, of the conversion of T eff cells into induced T reg cells (Zheng et al., 2007), the re-expression of Foxp3 in ex-T reg cells (Zhou et al., 2009), or the increased recruitment of T reg cells in the pancreas.

We also observed that IL-2 treatment was associated with a rise in the expression of molecules associated with T reg cell function such as CD25, Foxp3, CTLA-4 (CTL antigen 4), inducible T cell costimulator (ICOS), and glucocorticoid-induced TNF receptor (GITR; Fig. 3, c and d). Again, this effect was only noticed in pancreas-infiltrating T reg cells and not in T eff cells of the islets or PLN (Fig. S1 b).

Similar analyses were repeated in new-onset diabetic mice. In this case, in which high percentages of pancreatic T reg cells are already present before treatment, we did not observe a further increase in their numbers (Fig. 3 e). However, and as in prediabetic mice, IL-2 treatment induced a significant rise

or treated with daily injections of 25,000 IU IL-2 for 3 or 5 d (days 3 and 5). $n = 2$ –5 mice per group. The graph is representative of three independent experiments. (c and f) Mean fluorescence intensity (MFI) of CD25 and Foxp3 expression among CD4⁺Foxp3⁺ cells infiltrating the spleen, PLN, and pancreas, expressed as relative percentage from the mean fluorescence intensity value in the spleen, which has an arbitrary value of 100%. Graphs show cumulative mean data \pm SEM from control mice (black) and mice treated with IL-2 for 5 d (white), from four to six independent experiments. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$. A representative histogram of CD25 and Foxp3 intensities on CD4⁺ gated islet cells is shown for new onset diabetic animals (f, right). (d) Expression of the indicated molecules by CD4⁺Foxp3⁺ cells from mice treated with PBS (gray) or IL-2 (white) for 5 d. Graphs are representative of two to six independent experiments.

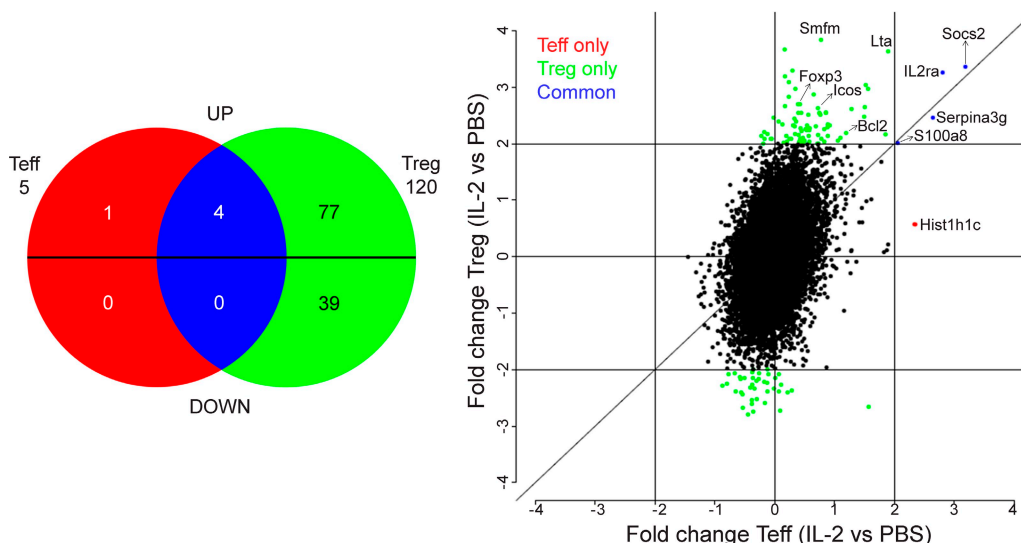


Figure 5. In vivo IL-2 treatment selectively modifies the T reg cell transcriptome. Gene array analysis was performed on FACS-sorted T eff cells and T reg cells from spleen and LN of Foxp3-GFP NOD mice treated with PBS or IL-2, as in Fig. 3. (Left) Venn diagram comparing the two gene lists (T eff cell–IL-2 vs. T eff cell–PBS and T reg cell–IL-2 vs. T reg cell–PBS) filtered at twofold changes and with overlapping probes discarded. Probes are separated in up- or down-regulation by IL-2 from reference PBS. Genes modified by IL-2 only in T eff cells are in red, only in T reg cells are in green, and in both subsets are in blue. Each number represents the number of genes in each subgroup. (Right) Fc/Fc plot comparison of fold change expression values of IL-2 effect on T reg cells versus T eff cells for probes, with detection p -values <0.05 . Only significant probes with fold change ≥ 2 are colored. Data are from one experiment with biological duplicates for each condition.

in the expression of CD25 and Foxp3 in pancreatic T reg cells but not in lymphoid tissues (Fig. 3 f).

To evaluate if the specific effect of IL-2 on pancreatic T reg cells was unique to this nonlymphoid tissue, we studied the effect of IL-2 on T reg cells residing in other nonlymphoid sites, such as salivary glands, skin, colon, and liver. The percentage of T reg cells only significantly augmented after IL-2 administration in the salivary glands (Fig. S2 a). However, IL-2 treatment induced the up-regulation of CD25 expression in all the assessed tissues and a minimal increase of Foxp3 expression in salivary glands and liver (Fig. S2 b).

The dual specificity achieved by the low-dose IL-2 treatment is noteworthy. IL-2 effects are more marked in tissues with ongoing autoimmunity (pancreas and salivary glands) at the spatial level and to the T reg cells at the cellular level. This could be explained by the fact that there is a local deficit of IL-2, at least in the pancreas of NOD mice (Tang et al., 2008), and that exogenous low-dose IL-2 administration corrects this particular deficiency.

IL-2 treatment decreases IFN- γ production in the pancreas

IL-10, IL-2, and TGF- β can contribute to the control of pancreatic inflammation (Rabinovitch et al., 2002; You et al., 2007; Tang et al., 2008). Thus, we assessed the production of these cytokines by pancreas-infiltrating T cells after 5 d of IL-2 or PBS treatment in prediabetic mice. The proportions of CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ T cell subsets among total CD45 $^{+}$ cells were similar in PBS- versus IL-2-treated animals (33 ± 13 vs. 31 ± 15 , $n = 11$, respectively for CD4 $^{+}$ T cells and 10 ± 5 vs. 9 ± 7 , $n = 10$, respectively for CD8 $^{+}$ T cells). IL-10 and IL-2 production were not significantly increased in the CD4 $^{+}$ T cells

of IL-2-treated animals and we could not detect TGF- β under the same stimulation conditions (Fig. 4 a).

We then studied the production of TNF, IL-17, and IFN- γ , which are known to be toxic for β cells. TNF production by T cells, macrophages, and dendritic cells remained unchanged under IL-2 treatment (Fig. 4 a and not depicted) and similar small amounts of IL-17 were detected in control and IL-2-treated mice (Fig. 4 a). Remarkably, IL-2 treatment induced an important reduction of IFN- γ production by both CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ pancreas-infiltrating T cells but no change in the PLN of prediabetic treated animals (Fig. 4, b and c).

Interestingly, when we repeated the experiment in new onset diabetic mice, IFN- γ production in IL-2-treated mice was also massively suppressed, specifically in pancreatic CD8 $^{+}$ T cells and to a lesser extent in PLN CD4 $^{+}$ T cells (Fig. 4 d). Consistent with this, it has been shown that T reg cells limit IFN- γ production specifically in the pancreas, precluding the progression from nondestructive insulinitis to diabetes (Feuerer et al., 2009). Also, a similar reduction of intra-islet IFN- γ production is associated with other treatments shown to prevent T1D development in NOD mice, such as CFA, BCG, all-trans retinoic acid, and p277 peptide treatments (Ablamunits et al., 1998; Serreze et al., 2001; Van et al., 2009). These data suggest that one of the mechanisms of action of low-dose IL-2 is the limitation of IFN- γ production by the pancreas-infiltrating T cells.

In vivo low-dose IL-2 treatment selectively modifies the T reg cell transcriptome, leaving the T eff cell gene profile practically unaltered

To have a global understanding of the mode of action of low-dose IL-2 on T cells in vivo, we performed gene array analysis.

We compared the transcriptome of highly purified T reg cells and T eff cells obtained from spleen and LNs of Foxp3-GFP NOD mice that received the same low-dose IL-2 treatment that cured new onset diabetic mice (T reg cell-IL-2 and T eff cell-IL-2) or PBS (T reg cell-PBS and T eff cell-PBS).

Analysis of genes with a fold change equal to or greater than two revealed that in T reg cells, IL-2 induced the over-expression of 81 genes and down-regulation of 39 genes (Fig. 5, green). Surprisingly, only the expression of five genes (out of the ~31,500 present in the gene chip) was modified in T eff cells. Four were also up-regulated in T reg cells (*Socs2*, *IL2Ra*, *Serpina3g*, and *S100a8*; Fig. 5, blue) and one was up-regulated only in T eff cells (*Hist1h1c*; Fig. 5, red). This result puts forward that nonspecific activation of pathogenic T eff cells as a result of low-dose IL-2 administration is less likely.

The complete list of genes affected by IL-2 treatment in T reg cells is shown in Fig. S3. Globally, most of these 120 genes do not have a direct relationship with the biology and suppressive function of T reg cells, which is in accordance with the absence of effect of IL-2 on peripheral T reg cells that we observed in our FACS analysis (Table S1 and Fig. 3). Only a few genes involved in T reg cell function and survival, such as *IL-2Ra*, *Foxp3*, *Icos*, and *Bcl-2*, were up-regulated by IL-2. This increased mRNA expression was only reflected by a minor, but nonstatistically significant, augmentation of the protein expression for CD25 and Foxp3 (Fig. 3 c) and no modification for ICOS protein expression (Fig. 3 d) in T reg cells of lymphoid tissues. Interestingly, the important rise in the expression level of these three proteins in pancreatic T reg cells (Fig. 3, c and d) could reflect an enhanced sensibility to IL-2 caused by a local deficit of this cytokine in this tissue (Tang et al., 2008).

In conclusion, we show that a short course of low-dose IL-2 administration at diabetes onset can reverse established disease in NOD mice. This effect is long lasting and inefficient in the absence of naturally occurring T reg cells. The main mechanism seems to be an increased T reg cell activity in the pancreas. Drugs that boost the patients' T reg cell compartment are under extensive investigation. This approach has been tested in a clinical trial using agonistic α -CD28 (Suntharalingam et al., 2006) and in preclinical models with high doses of IL-2, IL-2/ α -IL-2 complex, or Flt3-L (Swee et al., 2009). However, secondary effects caused by an action of these drugs on other cells, such as NK and T eff cells, have been observed and these drugs can lead to a systemic increase of T reg cells. As opposed to these treatments, low-dose IL-2 appears to act specifically on T reg cells in inflamed nonlymphoid tissues, with no detectable effect on other cells, minimizing the risk of generalized immune suppression. There is one ongoing clinical trial testing the use of IL-2 combined with rapamycin to treat T1D patients (NCT00525889), a combination which has been shown to prevent disease in mice (Rabinovitch et al., 2002), but neither IL-2 alone nor its association with rapamycin have ever been shown to cure established disease. Our findings, together with the fact that

IL-2 has been used in the clinic for >25 yr, constitute the first preclinical data indicating that low-dose IL-2 can control established autoimmunity and may place IL-2 as a safe therapeutic option for the treatment of pathologies with local and chronic inflammation.

MATERIALS AND METHODS

Mice. NOD mice were obtained from Charles River Laboratories or from our own colony. NOD Cd28^{-/-} (Lenschow et al., 1996) and NOD mice expressing GFP under the control *Foxp3* gene promoter (generated by V. Kuchroo, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA) were maintained in our animal facility under specific pathogen-free conditions in agreement with current European legislation on animal care, housing, and scientific experimentation. All protocols were approved by The Regional Ethics Committee in Animal Experiment N°3 of Ile-de-France region.

IL-2 treatment. Mice were treated with daily i.p. injections of 25,000 IU of recombinant human IL-2 (Proleukin; Novartis), 250,000 IU IL-2, or 0.5 μ g of recombinant mouse IL-2 and 5 μ g of anti-IL-2 mAb complex for 5 consecutive days. For Cd28^{-/-} mice, treatment was done during 10 d. Denatured IL-2 was used as control. Glycosuria was measured using colorimetric strips (Multistix; Bayer) and glycemia was quantified by a glucometer (Optium Xceed; Abbott Diabetes Care).

Spleen, LN, and tissue-infiltrating lymphocyte preparation. Spleen and LN were isolated and dissociated in PBS 3% FCS. For the other tissues and organs, mice were perfused with 0.9% NaCl, digested with collagenase/DNase solution, and filtered, as previously described (Cassan et al., 2006). For pancreas and liver, a percoll density gradient step was performed as previously described (Baekkeskov et al., 1981).

Antibodies and flow cytometry analysis. Anti-CD4, anti-CD25, anti-CD314 (NKG2D), anti-ICOS, anti-B220, anti-GITR, anti-CD44, anti-CTLA-4, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-IL-2, anti-IL-10, anti-TNF, anti-IL-17, anti-IFN- γ , and anti-Ki67 labeled with PE, allophycocyanin, PerCP, or Alexa Fluor 700, were purchased from BD. The PE- or Pacific blue-labeled anti-Foxp3 staining was performed using a kit (eBioscience). In some cases, anti-Ki67 antibody (Ab) was added together with the anti-Foxp3 Ab. For intracellular cytokine staining, cells were restimulated with 1 μ g/ml PMA (Sigma-Aldrich) and 0.5 μ g/ml ionomycin (Sigma-Aldrich) for 4 h in the presence of 1 μ l/ml GolgiPlug (BD). After cell surface staining, intracellular staining was performed using the Cytotfix/Cytoperm kit (BD). Cells were acquired on an LSR II (BD) and analyzed with FlowJo (Tree Star, Inc.) software.

Histology. Pancreas were fixed in formol solution and processed for paraffin embedding. 5- μ m-thick sections were stained with hematoxylin/eosin and the degree of insulinitis was evaluated microscopically.

Sample generation and DNA microarray hybridization and analysis. GFP-NOD mice were treated for 5 d with PBS or 25,000 IU IL-2 and sacrificed 2 h after the last injection. Untouched CD4⁺ T cells were enriched by magnetic cell separation (CD4⁺ T Cell Isolation kit; Miltenyi Biotec), labeled with CD4-PE Ab, and FACS sorted as CD4⁺GFP⁺ (T reg cells) and CD4⁺GFP⁻ (T eff cells). RNA was generated (RNeasy Mini kit; QIAGEN) from the sorted cells. RNA quality was verified in a Bioanalyzer (Agilent Technologies) and measured with a NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Microarray experiments were performed on a MouseWG-6 BeadChip (Illumina), a genome-wide array with 45,282 probes. Data were extracted and Quantile normalized using BeadStudio software (Illumina). The working lists were created, filtering probes with detection p-values <0.05 for at least half of the chips involved in the comparison and discarding overlapping probes. Each dataset was derived from two biologically independent replicate samples. Independent samples were compared by computing fold ratios and filtered at twofold. The Microarray data accession no. is E-MEXP-2689.

Statistical analyses. Statistical significances were calculated using the two-tailed unpaired Student *t* test with 95% confidence intervals.

Online supplemental material. Fig. S1 shows that T eff cell division and phenotype are not modified by low-dose IL-2 treatment. Fig. S2 provides information on IL-2 effect on T reg cells in different nonlymphoid tissues. Fig. S3 shows a heat map of IL-2 effect on T reg cell gene expression. Table S1 shows the systemic effects of low and high doses of IL-2. Online supplemental material is available at <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20100209/DC1>.

We thank Professors Vijay Kuchroo and Anne Cooke for providing us with the Foxp3-GFP NOD mice, Professor Jose Cohen and Alexandre Boissonnas for critical reading of the manuscript, and Gaëlle Martin for technical help.

This work was supported by the Juvenile Diabetes Research Foundation (1-2005-1056) and Agence Nationale de la Recherche (ANR-05-MIIM-003-01). Y. Grinberg-Bleyer, A. Baeyens, and G. Fourcade were supported by Ministère de la Recherche.

The authors have no conflicting financial interests.

Submitted: 1 February 2010

Accepted: 23 June 2010

REFERENCES

- Ablamunits, V., D. Elias, T. Reshef, and I.R. Cohen. 1998. Islet T cells secreting IFN- γ in NOD mouse diabetes: arrest by p277 peptide treatment. *J. Autoimmun.* 11:73–81. doi:10.1006/jaut.1997.0177
- Ahmazadeh, M., and S.A. Rosenberg. 2006. IL-2 administration increases CD4⁺ CD25(hi) Foxp3⁺ regulatory T cells in cancer patients. *Blood*. 107:2409–2414. doi:10.1182/blood-2005-06-2399
- Baekkeskov, S., T. Kanatsuna, L. Klareskog, D.A. Nielsen, P.A. Peterson, A.H. Rubenstein, D.F. Steiner, and A. Lernmark. 1981. Expression of major histocompatibility antigens on pancreatic islet cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78:6456–6460. doi:10.1073/pnas.78.10.6456
- Battaglia, M., A. Stabilini, and M.G. Roncarolo. 2005. Rapamycin selectively expands CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ regulatory T cells. *Blood*. 105:4743–4748. doi:10.1182/blood-2004-10-3932
- Cassan, C., E. Piaggio, J.P. Zappulla, L.T. Mars, N. Couturier, F. Bucciarelli, S. Desbois, J. Bauer, D. Gonzalez-Dunia, and R.S. Liblau. 2006. Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.* 177:1552–1560.
- Chatenoud, L., and J.A. Bluestone. 2007. CD3-specific antibodies: a portal to the treatment of autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 7:622–632. doi:10.1038/nri2134
- Chen, X., J.J. Oppenheim, R.T. Winkler-Pickett, J.R. Ortaldo, and O.M. Howard. 2006. Glucocorticoid amplifies IL-2-dependent expansion of functional FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells in vivo and enhances their capacity to suppress EAE. *Eur. J. Immunol.* 36:2139–2149. doi:10.1002/eji.200635873
- Feuerer, M., Y. Shen, D.R. Littman, C. Benoist, and D. Mathis. 2009. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity*. 31:654–664. doi:10.1016/j.immuni.2009.08.023
- Lenschow, D.J., K.C. Herold, L. Rhee, B. Patel, A. Koons, H.Y. Qin, E. Fuchs, B. Singh, C.B. Thompson, and J.A. Bluestone. 1996. CD28/B7 regulation of Th1 and Th2 subsets in the development of autoimmune diabetes. *Immunity*. 5:285–293. doi:10.1016/S1074-7613(00)80323-4
- Malek, T.R. 2008. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* 26:453–479. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090357
- Mellanby, R.J., D. Thomas, J.M. Phillips, and A. Cooke. 2007. Diabetes in non-obese diabetic mice is not associated with quantitative changes in CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunology*. 121:15–28. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02546.x
- Papiernik, M., M.L. de Moraes, C. Pontoux, F. Vasseur, and C. Pénit. 1998. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R α chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int. Immunol.* 10:371–378. doi:10.1093/intimm/10.4.371
- Rabinovitch, A., W.L. Suarez-Pinzon, A.M. Shapiro, R.V. Rajotte, and R. Power. 2002. Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 51:638–645. doi:10.2337/diabetes.51.3.638
- Sadlack, B., H. Merz, H. Schorle, A. Schimpl, A.C. Feller, and I. Horak. 1993. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell*. 75:253–261. doi:10.1016/0092-8674(93)80067-O
- Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, and T. Nomura. 2006. Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212:8–27. doi:10.1111/j.0105-2896.2006.00427.x
- Salomon, B., D.J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, and J.A. Bluestone. 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*. 12:431–440. doi:10.1016/S1074-7613(00)80195-8
- Serreze, D.V., K. Hamaguchi, and E.H. Leiter. 1989. Immunostimulation circumvents diabetes in NOD/Lt mice. *J. Autoimmun.* 2:759–776. doi:10.1016/0896-8411(89)90003-6
- Serreze, D.V., H.D. Chapman, C.M. Post, E.A. Johnson, W.L. Suarez-Pinzon, and A. Rabinovitch. 2001. Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: sometimes an outcome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by immunostimulation. *J. Immunol.* 166:1352–1359.
- Shoda, L.K., D.L. Young, S. Ramanujan, C.C. Whiting, M.A. Atkinson, J.A. Bluestone, G.S. Eisenbarth, D. Mathis, A.A. Rossini, S.E. Campbell, et al. 2005. A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation. *Immunity*. 23:115–126. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.002
- Suntharalingam, G., M.R. Perry, S. Ward, S.J. Brett, A. Castello-Cortes, M.D. Brunner, and N. Panoskaltis. 2006. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* 355:1018–1028. doi:10.1056/NEJMoa063842
- Swee, L.K., N. Bosco, B. Malissen, R. Ceredig, and A. Rolink. 2009. Expansion of peripheral naturally occurring T regulatory cells by Fms-like tyrosine kinase 3 ligand treatment. *Blood*. 113:6277–6287. doi:10.1182/blood-2008-06-161026
- Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, and J.A. Bluestone. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J. Exp. Med.* 199:1455–1465. doi:10.1084/jem.20040139
- Tang, Q., J.Y. Adams, C. Penaranda, K. Melli, E. Piaggio, E. Sgouroudis, C.A. Piccirillo, B.L. Salomon, and J.A. Bluestone. 2008. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity*. 28:687–697. doi:10.1016/j.immuni.2008.03.016
- Van, Y.H., W.H. Lee, S. Ortiz, M.H. Lee, H.J. Qin, and C.P. Liu. 2009. All-trans retinoic acid inhibits type 1 diabetes by T regulatory (Treg)-dependent suppression of interferon- γ -producing T-cells without affecting Th17 cells. *Diabetes*. 58:146–155. doi:10.2337/db08-1154
- Vella, A., J.D. Cooper, C.E. Lowe, N. Walker, S. Nutland, B. Widmer, R. Jones, S.M. Ring, W. McArdle, M.E. Pembrey, et al. 2005. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 76:773–779. doi:10.1086/429843
- Yamanouchi, J., D. Rainbow, P. Serra, S. Howlett, K. Hunter, V.E. Garner, A. Gonzalez-Munoz, J. Clark, R. Veijola, R. Cubbon, et al. 2007. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat. Genet.* 39:329–337. doi:10.1038/ng1958
- You, S., B. Leforban, C. Garcia, J.F. Bach, J.A. Bluestone, and L. Chatenoud. 2007. Adaptive TGF- β -dependent regulatory T cells control autoimmune diabetes and are a privileged target of anti-CD3 antibody treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:6335–6340. doi:10.1073/pnas.0701171104
- Zhang, H., K.S. Chua, M. Guimond, V. Kapoor, M.V. Brown, T.A. Fleisher, L.M. Long, D. Bernstein, B.J. Hill, D.C. Douek, et al. 2005. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat. Med.* 11:1238–1243. doi:10.1038/nm1312
- Zheng, S.G., J. Wang, P. Wang, J.D. Gray, and D.A. Horwitz. 2007. IL-2 is essential for TGF- β to convert naive CD4⁺CD25⁺ cells to CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J. Immunol.* 178:2018–2027.
- Zhou, X., S.L. Bailey-Bucktrout, L.T. Jeker, C. Penaranda, M. Martínez-Llordella, M. Ashby, M. Nakayama, W. Rosenthal, and J.A. Bluestone. 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat. Immunol.* 10:1000–1007. doi:10.1038/ni.1774

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Grinberg-Bleyer et al., <http://www.jem.org/cgi/content/full/jem.20100209/DC1>

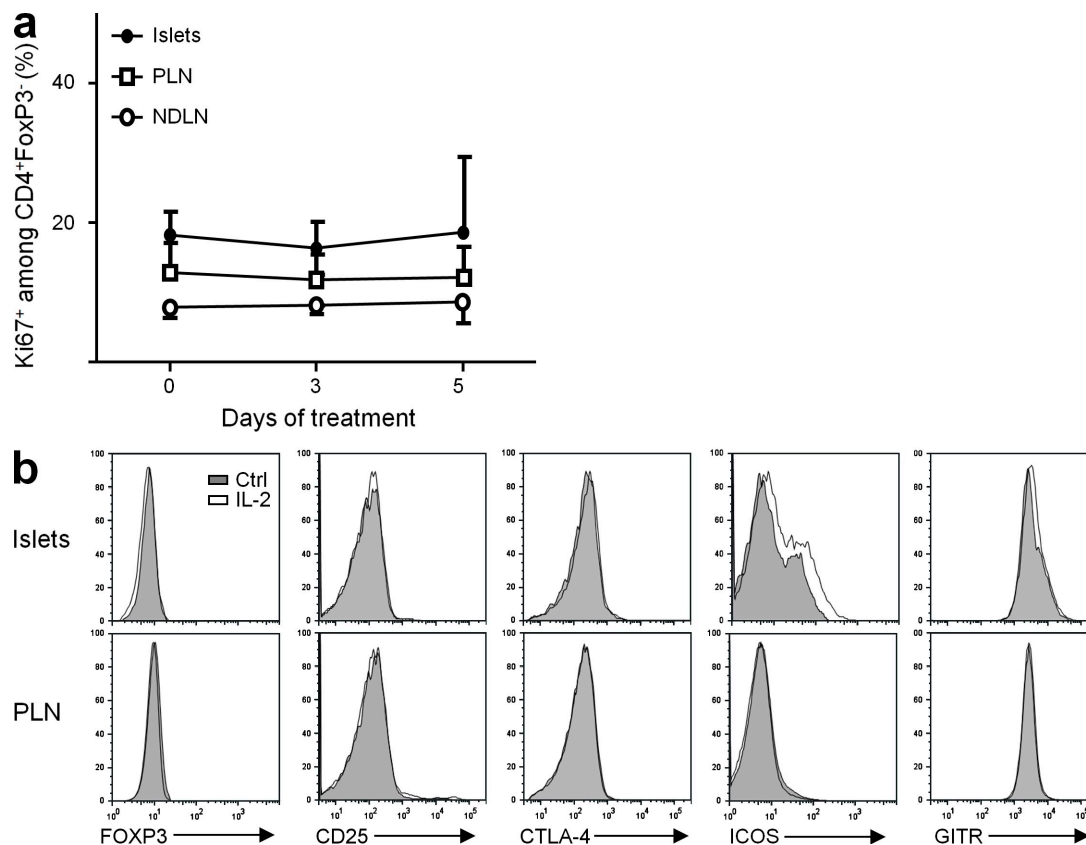


Figure S1. T eff cell division and phenotype are not modified by low-dose IL-2 treatment. (a) Percentage of Ki67⁺ cells among CD4⁺Foxp3⁻ cells from islets, PLN, and nondraining LN (NDLN) of PBS or IL-2-treated prediabetic mice. Shown are mean data from three independent experiments with three to seven mice per group. (b) Expression of the indicated molecules by CD4⁺Foxp3⁻ cells from mice treated with PBS (gray) or IL-2 (white) for 5 d, as in Fig. 3. Histograms are representative of two to four independent experiments.

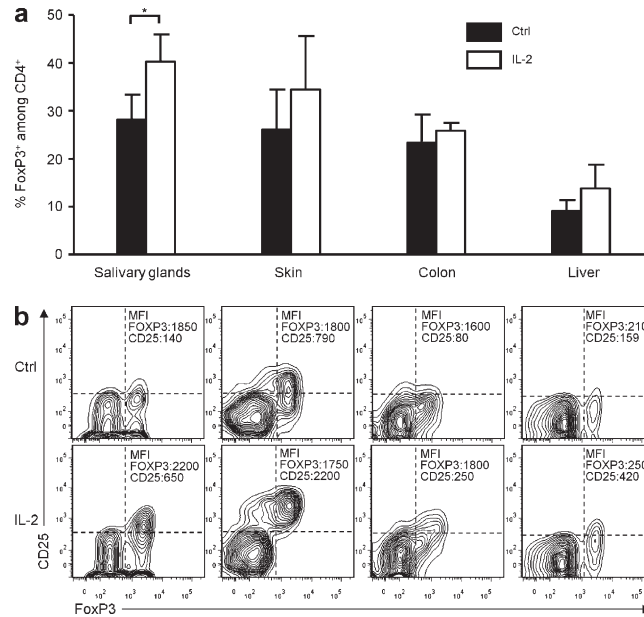


Figure S2. IL-2 effect on T reg cells in different nonlymphoid tissues. Prediabetic NOD mice were treated for 5 d with PBS (Ctrl) or 25,000 IU IL-2. Indicated tissues were harvested and stained for CD45, CD4, CD25, and FoxP3. (a) Percentage of FoxP3⁺ cells among CD45⁺CD4⁺ T cells. Graph shows cumulative mean data \pm SEM from control (black) and IL-2-treated mice (white) from four independent experiments with two to six mice per group. *, $P < 0.05$. (b) Representative images of CD25 and Foxp3 staining on CD4⁺CD45⁺ gated cells from each tissue. Quadrants delimit the nonspecific staining obtained with the isotype control antibodies. Mean fluorescence intensity values of Foxp3 and CD25 gated on Foxp3⁺ cells are indicated in each image.

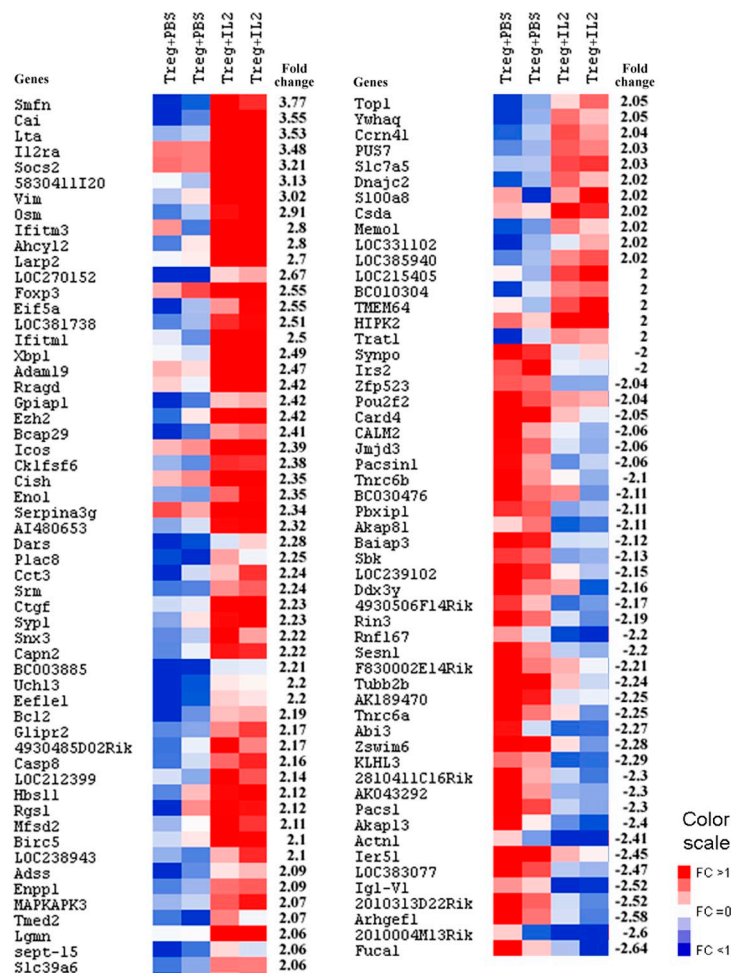


Figure S3. Heat map of IL-2 effect on T reg cell gene expression. The list includes the genes from the comparison of the T reg cell-PBS versus the T reg cell-IL-2 lists, filtered at twofold changes. The intensity of blue and red colors indicates the degree of down or up-regulation, respectively. The fold change for each gene is indicated in the Fc column. Data are from one experiment with biological duplicates for each condition.

Table S1. Systemic effects of low and high doses of IL-2

	Number of mice	Absolute number	CD4 ⁺	FoxP3 ⁺ / CD4 ⁺	CD25 ⁺ FoxP3 ⁻ / CD4 ⁺	CD8 ⁺	FoxP3 ⁺ /CD8 ⁺	CD11b ⁺	NKG2D ⁺ CD8 ⁻	B220 ⁺
		$\times 10^6$	%	%	%	%	%	%	%	%
Spleen										
Control	16–26	107 \pm 46	26 \pm 4	14 \pm 2	1.8 \pm 1.4	9.1 \pm 2.1	0.6 \pm 0.2	3.5 \pm 1.9	2.0 \pm 0.7	44 \pm 7
IL-2 25,000 IU	16–26	97 \pm 26	24 \pm 3	16 \pm 3	2.1 \pm 1.4	8.8 \pm 1.5	0.6 \pm 0.2	4.6 \pm 3.7	1.9 \pm 0.6	42 \pm 9
IL-2 250,000 IU	2–5	137 \pm 23	25 \pm 2	24 \pm 3**	5.8 \pm 3.0**	10.0 \pm 2.8	0.9 \pm 0.3*	3.7 \pm 2.1	1.5 \pm 0.8	ND
PLN										
Control	9–21	4.1 \pm 2.0	52 \pm 8	13 \pm 3	1.0 \pm 0.4	17 \pm 3	0.8 \pm 0.4	0.7 \pm 0.4	0.6 \pm 0.4	23.7 \pm 6.8
IL-2 25,000 IU	10–19	5.3 \pm 2.4	52 \pm 7	15 \pm 3	1.0 \pm 0.4	17 \pm 3	0.6 \pm 0.1	0.9 \pm 0.4	0.6 \pm 0.3	25.9 \pm 3.9
IL-2 250,000 IU	2–5	11.4 \pm 2.2**	50 \pm 8	15 \pm 0.5	1.0 \pm 0.7	15 \pm 3	1.0 \pm 0.2	1.1 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	22.9 \pm 1.9

Prediabetic (8–15 wk) NOD mice were treated during 5 d with PBS (control), 25,000 IU, or 250,000 IU IL-2 and analyzed 2 h after the last injection. Total cell numbers in the spleen and PLN were quantified and percentage of different hematopoietic populations was obtained by FACS. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$. Data were obtained from two to six independent experiments.

Limitations of IL-2 and Rapamycin in Immunotherapy of Type 1 Diabetes

Audrey Baeyens,^{1,2,3} Louis Pérol,^{1,2,3} Gwladys Fourcade,^{1,2,3} Nicolas Cagnard,^{4,5} Wassila Carpentier,⁶ Janine Woytschak,⁷ Onur Boyman,^{7,8} Agnès Hartemann,^{9,10} and Eliane Piaggio^{1,2,3}

Administration of low-dose interleukin-2 (IL-2) alone or combined with rapamycin (RAPA) prevents hyperglycemia in NOD mice. Also, low-dose IL-2 cures recent-onset type 1 diabetes (T1D) in NOD mice, partially by boosting pancreatic regulatory T cells (T_{reg} cells). These approaches are currently being evaluated in humans. Our objective was to study the effect of higher IL-2 doses (250,000–500,000 IU daily) as well as low-dose IL-2 (25,000 IU daily) and RAPA (1 mg/kg daily) (RAPA/IL-2) combination. We show that, despite further boosting of T_{reg} cells, high doses of IL-2 rapidly precipitated T1D in prediabetic female and male mice and increased myeloid cells in the pancreas. Also, we observed that RAPA counteracted IL-2 effects on T_{reg} cells, failed to control IL-2–boosted NK cells and broke IL-2–induced tolerance in a reversible way. Notably, the RAPA/IL-2 combination failure to cure T1D was associated with an unexpected deleterious effect on glucose homeostasis at multiple levels, including β -cell division, glucose tolerance, and liver glucose metabolism. Our data help to understand the therapeutic limitations of IL-2 alone or RAPA/IL-2 combination and could lead to the design of improved therapies for T1D. *Diabetes* 62:1–12, 2013

In type 1 diabetes (T1D), the immune system destroys the pancreatic β cells (1). At clinical onset, ~30% of β cells are still able to produce insulin (2), thus stopping autoimmune destruction, which at this stage is a promising approach (3). Along the same lines, there is a growing list of phase I/II clinical trials based on immunomodulation that are currently being conducted in T1D patients (4).

NOD mice, which develop spontaneous T1D, represent an accepted model for testing new therapies (5), the gold standard being that treatments that cure overt hyperglycemia in these mice may be most appropriate for translation into the clinic, as was the case for anti-CD3 antibodies (Abs)

(6), which have been tested in patients with promising results (7). In addition, results from our own group showing that low-dose interleukin-2 (IL-2) can prevent (8) and revert disease in NOD mice (9), have led to the translation of this strategy into clinical trials in T1D patients (Clinical trial reg. no. NCT01353833, clinicaltrials.gov).

We have shown that in NOD mice, administration of low-dose IL-2 for 5 days induced the remission of new-onset T1D by specifically boosting regulatory T cells (T_{reg} cells) in the pancreas without activating pathogenic effector T cells (T_{eff} cells). However, remission was obtained in only 60% of treated mice, and half of them became diabetic again during the following months (9). Consequently, improving IL-2 therapy by optimizing dosing or combining IL-2 with other immunomodulatory drugs, such as rapamycin (RAPA), could be of great importance for the goal of translating this therapy to humans.

RAPA has been used in clinical transplantation for many years (10), and it has been safely administered to T1D patients during islet transplantation (11,12). In mice, RAPA monotherapy can prevent T1D development (13); however, it is unable to induce disease reversal (14). Moreover, RAPA and IL-2 were found to be synergistic for the prevention of diabetes in NOD mice (13). Consequently, we decided to test whether RAPA could synergize with short-term IL-2 therapy to reverse T1D and reinforce the development of long-term tolerance.

In this work, we have further studied the mechanisms of action of IL-2 and RAPA alone or in combination in the NOD model of T1D.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Mice. NOD mice were bred in our animal facility under specific pathogen-free conditions in agreement with current European legislation. Protocols were approved by The Ethics Committee in Animal Experiment Charles Darwin, France (no. Ce5/2012/021).

IL-2 and RAPA treatment. Mice were treated with daily intraperitoneal injections of 25,000, 250,000, or 500,000 IU of recombinant human IL-2 (Pro-leukin; Novartis France) for the indicated time. RAPA (Rapamune; Wyeth-Lederle) was administered at 1 mg/kg per os, a dose that has been previously reported not to be toxic to pancreatic islets (13,14) and to prevent T1D onset in NOD mice (13). Glycosuria was measured using colorimetric strips (Multistix; Bayer), and blood glucose levels were quantified by a glucometer (Optium Xceed; Abbott).

Spleen-, lymph node-, and tissue-infiltrating lymphocytes preparation. Spleen and lymph nodes (LNs; axillary and brachial) and pancreatic draining LNs (DLNs) were isolated and dissociated in PBS-3% FCS. For pancreas-infiltrating lymphocyte preparation, the whole pancreas was digested with collagenase/DNase solution and submitted to Percoll density gradient as described (15,16).

Abs and flow cytometry analysis. Anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45.1, anti-inducible T-cell costimulator (ICOS), anti-B220, anti-glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR), anti-Ly6C, anti-Ly6G, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD19, anti-Gr1, anti-IFN- γ , anti-Ki67, anti-pStat5 (pY694), and streptavidin-labeled with phycoerythrin (PE), allophycocyanin, perCP, PerCP-Cy5.5, V500, allophycocyanin (APC)-H7, PE-Cy7, Alexa Fluor-700, Alexa Fluor-647, or biotin, were from BD Biosciences. Anti-CD25, anti-cytotoxic

From ¹Université Pierre et Marie Curie, Paris, France; ²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7211, Paris, France; the ³Department of Immunology-Immunopathology-Immunotherapy, INSERM U959, Paris, France; ⁴INSERM U580, Paris, France; the ⁵Bioinformatics Platform, Faculty of Medicine Paris Descartes, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; ⁶Plate-forme Post-Génomique P3S, Université Pierre et Marie Curie, Faculty of Medicine, Paris, France; the ⁷Laboratory of Applied Immunobiology, University of Zurich, Zurich, Switzerland; the ⁸Allergy Unit, Department of Dermatology, University Hospital Zurich, Zurich, Switzerland; the ⁹Department of Endocrinology, Nutrition and Diabetes, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Pitié-Salpêtrière-Charles Foix Hospital, Paris, France; and the ¹⁰Department of Medicine Faculty, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Corresponding author: Eliane Piaggio, eliane.piaggio@yahoo.com.

Received 8 February 2013 and accepted 8 May 2013.

DOI: 10.2337/db13-0214

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db13-0214/-/DC1>.

A.B. and L.P. contributed equally to this study.

L.P. is currently affiliated with INSERM 932, Paris, France, and Centre de Recherche, Laboratoire d'Immunologie Clinique, Institut Curie, Paris, France.

© 2013 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4), anti-NKp46, and anti-F4/80 labeled with fluorescein isothiocyanate (FITC), PE-Cy7, APC, or eFluor 450 were from eBiosciences. The eFluor 450-anti-Foxp3 staining was performed using the eBioscience kit. For intracellular cytokine staining, cells were restimulated with 1 μ g/mL phorbol myristate acetate (PMA)/0.5 μ g/mL ionomycin (Sigma) for 3 h, in the presence of GolgiPlug (1 μ L/mL) (BD Biosciences). For phospho-STAT5 staining, DLNs were dissociated, immediately fixed in PBS 1.5% formaldehyde and permeabilized in MeOH. Cells were stained in PBS 0.2% BSA medium containing anti-CD4, anti-CD25, anti-Foxp3, and anti-STAT5 monoclonal Abs. PE-conjugated NRP-V7/H-2^K tetramer containing NRP-V7 peptide (KYKANVFL) and control PE-conjugated TUM/H-2^K tetramer containing TUM peptide (KYQAVTTTL) were provided by Pere Santamaria. Cells were stained in RPMI 2% medium containing NRP-V7/H-2K or TUM/H-2K at room temperature for 2 h, washed, and further stained with anti-CD8 and anti-CD4 Abs. Cells were acquired on a LSR II (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (Tree Star) software.

Histology. Pancreas cells were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, cut into 2- μ m-thick sections, and stained with hematoxylin/eosin. Insulinitis scoring was evaluated microscopically.

For immunohistology, pancreas cells were embedded in optimal cutting temperature medium, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. The 8- μ m-thick sections were blocked with PBS 2% BSA, and stained with anti-mouse insulin (Sigma) followed by biotinylated anti-mouse IgG1 (Abcam) and APC-labeled streptavidin, PE-labeled anti-CD45.1 and FITC-labeled anti-Ki67 (BD Biosciences), and counterstained with Hoechst (Dako). Proliferating β cells were defined as Ki67⁺ Insulin⁺ CD45.1⁺ and manually counted. For CD11b staining, FITC-anti-CD11b (BD Biosciences) was used. Images were acquired on a Leica epifluorescence microscope and analyzed with Metavue Software.

Determination of wet weight of organs. Organs were weighed before and after lyophilization overnight at 58°C under vacuum, and wet weight was calculated by subtracting the initial weight from the weight after lyophilization, as described (17).

Glucose/insulin tolerance test. Twelve-week-old nondiabetic NOD female mice were treated for 5 days with PBS, 25,000 IU IL-2, IL-2, RAPA, or 25,000 IU IL-2 plus RAPA, and the last administration was performed 2 h before the beginning of the intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT)/insulin tolerance test (ITT). For IPGTTs, a single dose of 2 g glucose/kg was injected intraperitoneally after 16 h overnight fast. For ITTs, a single dose of 0.75 IU insulin/kg (Humulin R; Lilly) was injected intraperitoneally after 4 h fasting, and blood glucose levels were determined.

Sample generation and DNA microarray hybridization and analysis. Twelve-week-old nondiabetic NOD female mice were treated for 5 days with PBS, 25,000 IU IL-2, RAPA, or IL-2 plus RAPA. Mice were fasted for 16 h before the injection of a glucose bolus (2 g/kg) 2 h after the last administration of IL-2 and/or RAPA. Four hours after the glucose challenge, mice were killed, perfused with 0.9% NaCl, and liver was collected. Tissue was processed (TissueLyser II; Qiagen), and RNA was generated (RNeasy Mini kit; Qiagen). RNA quality was verified in an Agilent Bioanalyzer and measured with a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific).

Microarray experiments were performed on Illumina MouseWG-6 BeadChip. Data were quantile normalized using BeadStudio software. The working lists were created by filtering probes with detection P values <0.05 for all the chips and discarding overlapping probes. Each dataset was derived from three biologically independent replicate samples. Independent samples were compared by computing fold ratios and were filtered at a 1.5-fold threshold for Venn Diagrams and a 1.2-fold threshold for pathway analysis. For pathway analysis, GenBank accession numbers were mapped to the Ingenuity database (IPA, <http://www.ingenuity.com>) to retrieve relevant biological processes (microarray data accession number: E-MEXP-3789).

Statistical analyses. Statistical significance was calculated using a two-tailed unpaired Student t test with 95% confidence intervals. When sample distribution was not normal (as determined by a D'Agostino and Pearson omnibus normality test), a Mann-Whitney-Wilcoxon nonparametric test was used. Survival proportions were calculated using the Kaplan-Meier method, and statistical significance was calculated using the Gehan-Breslow-Wilcoxon test. All statistical significances were calculated with GraphPad Prism v5.0 software.

RESULTS

High doses of IL-2 are toxic and can precipitate T1D development. We have previously shown that five doses of 25,000 IU IL-2 could revert new-onset T1D in NOD mice in part by specifically boosting pancreatic T_{reg} cells (9). However, not all treated mice were cured, and in some of them the beneficial effects were transient. We reasoned that increasing the dose of IL-2 administered may further

increase the frequency of T_{reg} cells and thus improve the treatment efficacy.

We first tested the capacity of higher IL-2 doses to prevent T1D development. We found that daily treatment of NOD mice with 250,000 or 500,000 IU IL-2 (i.e., doses 10- or 20-fold higher than the dose shown to prevent T1D) (8) could be lethally toxic in a dose-dependent manner in 5-week-old mice (Fig. 1A, top). In prediabetic mice at 12–14 weeks of age, this treatment was less toxic, but it dramatically precipitated the onset of diabetes after only a few daily injections and in a dose-dependent manner (Fig. 1A, middle and bottom). At the 250,000 IU IL-2 dose, females were significantly more sensitive than males to IL-2-induced acceleration of diabetes (Fig. 1A, bottom).

IL-2 toxicity is mainly associated with vascular leak syndrome, which can lead to hypotension, pulmonary edema, liver cell damage, and even death (17). We thus measured organ edema after 5 days of high-dose IL-2 administration (Fig. 1B). Unlike C57BL/6 mice (17), higher cumulative doses of IL-2 were necessary before vascular leak syndrome became evident in NOD mice. Moreover, we observed sex-dependent differences, with lung edema being most prominent in males and liver edema in females. Brain edema did not develop in either group. Additionally, we measured islet infiltration in these mice and observed that 5 days of high-dose IL-2 administration induced a mild increase of invasive insulinitis in males (Fig. 1C).

The rapid onset of T1D, observed as early as after only 3 days of treatment, was not due to an immediate detrimental effect of IL-2 on glucose homeostasis, as administration of 250,000 IU IL-2 did not induce any apparent alteration in glucose metabolism after a glucose bolus administration 2 h after the IL-2 injection (Fig. 1D).

Low-dose IL-2-induced T1D remission was associated with T_{reg}-cell activation only in the pancreas, whereas T_{eff}, CD8⁺, and NK cells were not noticeably affected by this treatment (9). On the contrary, high-dose IL-2 induced systemic effects, including increased cell numbers in secondary lymphoid organs, most significantly in the pancreas DLN (Fig. 2A). In the DLN (Fig. 2B), nondraining LNs and spleen (not shown), significantly higher proportions of NK cells along with lower frequencies of total CD4⁺ T cells, but with increased T_{reg}-cell proportions, were observed.

In the islets, high-dose IL-2 effects were more pronounced (Fig. 2B). Notably, total CD4⁺ T cells were unchanged, but an almost double frequency of T_{reg} cells was seen after IL-2 treatment. Also NK, CD11c⁺, and CD11b⁺ cells increased after IL-2 administration. Interestingly, in almost all analyzed organs, T_{reg}, T_{eff}, CD8⁺, NK, B, and CD11b⁺ cells increased their division after high-dose IL-2 administration, as assessed by quantification of Ki67 expression (Fig. 2C). In particular, $>80\%$ of NK and CD11b⁺ cells had cycled in the pancreas. Indeed, by immunohistology analysis these highly proliferative CD11b⁺ cells were found interspersed around the islets and surrounding blood vessels (Fig. 3A). Further phenotypic analysis indicated that two subpopulations among CD11b⁺ cells increased during IL-2 treatment: CD11b⁺ Ly6C⁺ F4/80⁺ cells, likely representing tissue macrophages; and CD11b⁺ Ly6G⁺ cells, likely representing neutrophils (18) (Fig. 3B).

Detailed analysis of the effects of IL-2 on T_{reg} cells indicated that the cytokine increased the expression of Foxp3 and CD25 in a dose-dependent way, suggesting an enhancement of T_{reg} cell fitness (Fig. 4A). Similarly, even though the frequency of T_{eff} cells was diminished, their activation was potentiated by IL-2 administration, as

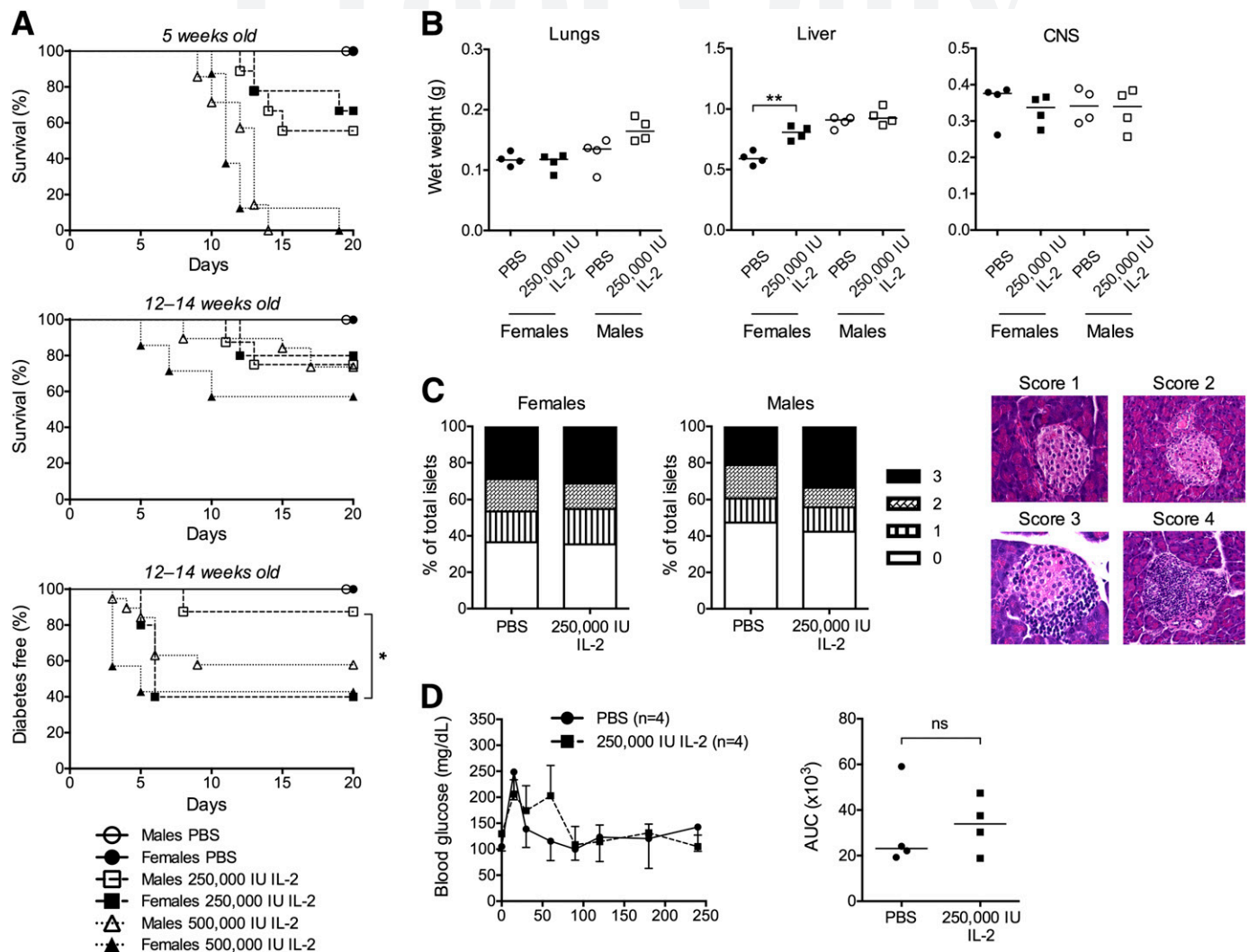


FIG. 1. Administration of high doses of IL-2 to NOD mice: toxicity and diabetes development. **A:** Male and female NOD mice 5 weeks of age (*top*) or 12–14 weeks of age (*middle and bottom*) were injected daily with PBS (●, females; ○, males), 250,000 IU IL-2 (■, females; □, males), or 500,000 IU IL-2 (▲, females; △, males) over 20 days. Shown are Kaplan-Meier survival curves of treated mice (*top and middle*) and the percentage of diabetes free mice; * $P < 0.05$ (Gehan-Breslow-Wilcoxon test) (*bottom*). **B and C:** Male and female NOD mice 12–14 weeks of age were injected for 5 days with PBS (●, females; ○, males) or 250,000 IU IL-2 (■, females; □, males) and analyzed 2 h after the last injection. **B:** Wet weight of lung (*left*), liver (*middle*), and CNS (*right*) were determined. Symbols represent individual mice and horizontal lines represent the median. ** $P < 0.01$ (unpaired, two-tailed Student *t* test). **C:** Histological quantification of islet infiltration by immune cells in female and male NOD mice. Shown are the percentages of islets with no infiltration (0), peri-insulinitis (1), moderate insulinitis with $<50\%$ islet area infiltrated by immune cells (2), and severe insulinitis with more than 50% islets area infiltrated by immune cells (3). Pictures show representative islets corresponding to the insulinitis score used for analysis. **D:** Prediabetic female NOD mice 12–16 weeks of age were fasted for 4 h and injected with PBS or 250,000 IU IL-2 followed by a glucose bolus 2 h later. Results are presented as blood glucose levels during the 4 h follow-up (*left*) and as area under the blood-glucose curve (AUC) during the follow-up period (*right*), symbols represent individual mice, and horizontal lines represent the median. Data are cumulative of two (*A, top*) to five (*A, middle and bottom*) independent experiments or are representative of one (*B and C*) to three (*D*) independent experiments. ns, not significant.

indicated by the dose-dependent increase in the fraction of CD25⁺ T_{eff} and CD8⁺ T cells, mainly observed in the islets (Fig. 4B). Moreover, T_{eff}, CD8⁺, and NK cells showed increased IFN- γ production (Fig. 4C) during treatment with high-dose IL-2. Additionally, among the expanded CD8⁺ T-cell population, we observed a significant increase in the frequencies of NRPV7⁺ islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein-specific autoreactive CD8 T cells (19) in the blood and the islets of the treated mice (Fig. 4D).

RAPA partially counteracts the activation of pancreatic T_{reg} cells induced by low-dose IL-2. The immunomodulatory effects of RAPA have been attributed to its capacity to preferentially affect activated T_{eff} cells, while T_{reg} cells

are less susceptible to its action (20). Consequently, we hypothesized that the beneficial effect of low-dose IL-2 on T_{reg} cells could synergize with the concomitant elimination of pathogenic T_{eff} cells by RAPA after administration of a RAPA/low-dose IL-2 combination.

We analyzed the effects of combined treatment on lymphoid cells in prediabetic NOD females, in which insulinitis is already important. Administration for 5 days of RAPA alone, low-dose IL-2 alone, or both drugs combined did not induce major changes in absolute numbers and frequencies of T cells in the spleen, LNs, and DLN (data not shown). In the pancreas, low-dose IL-2 alone did not modify the frequency of total CD8⁺ or CD4⁺ T cells (data not shown). However, it modified the T_{reg}/T_{eff} balance by increasing the

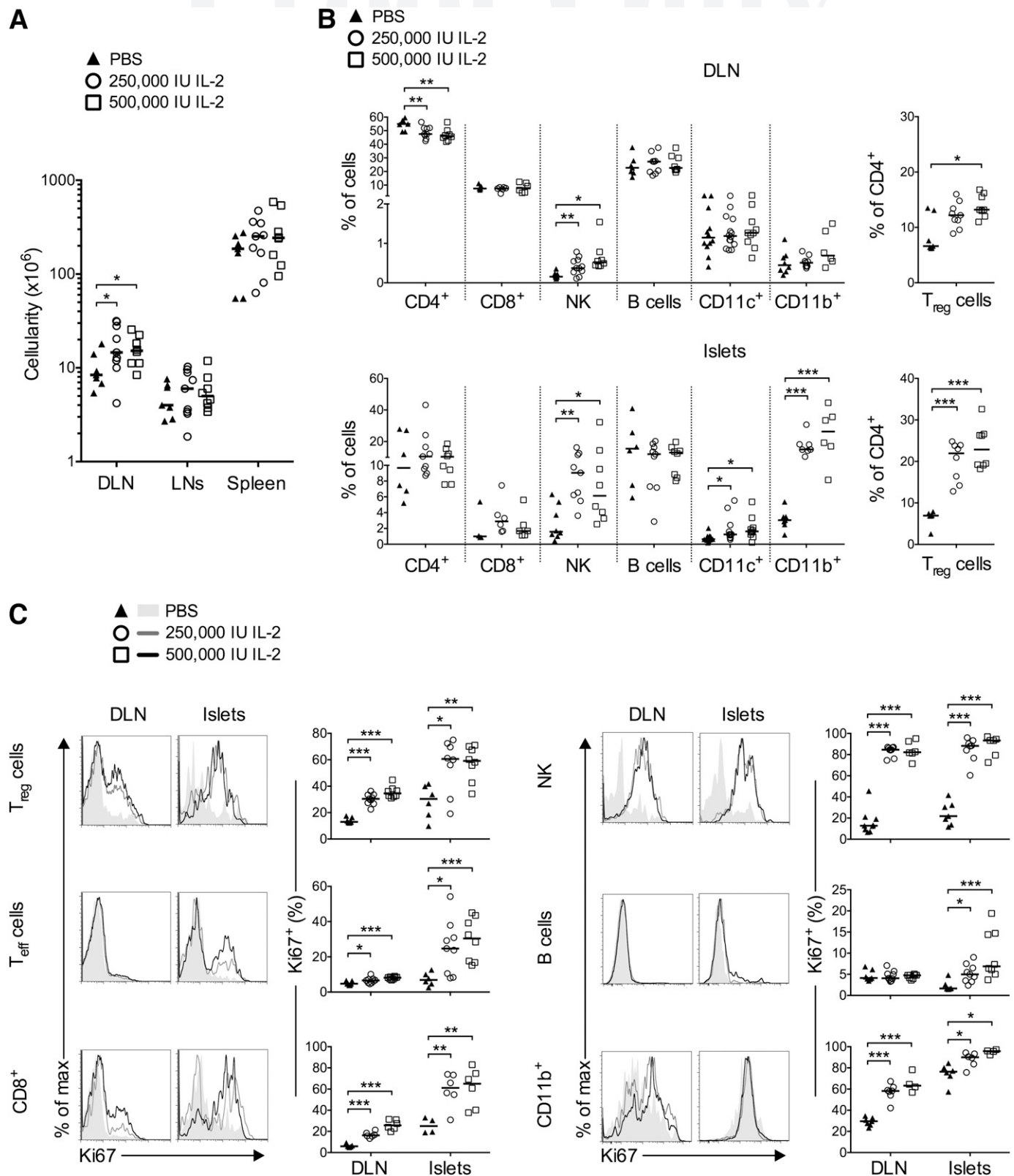


FIG. 2. Administration of high doses of IL-2 to NOD mice: effects on immune cells. Prediabetic female NOD mice 12–14 weeks of age were treated daily with PBS, 250,000 or 500,000 IU IL-2 over 5 days and analyzed 2 h after the last injection. **A:** Absolute cell numbers in DLN, nondraining LNs, and spleen. **B:** Percentage of total CD4⁺, CD8⁺, Nkp46⁺ CD3[−] (NK), B, CD11c⁺, and myeloid CD11b⁺ cells in DLN (*top*) or in pancreas (*bottom*). Right panels indicate the percentage of T_{reg} cells among total CD4⁺ T cells. **C:** Representative histograms of Ki67 expression (*left*) and percentages of Ki67⁺ cells among indicated populations (*right*) in the DLN and pancreas. Similar results were obtained in male NOD mice (data not shown). Data are cumulative of three to five independent experiments with 4 to 14 mice per group. Symbols represent individual mice, and horizontal lines represent the median. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student *t* test).

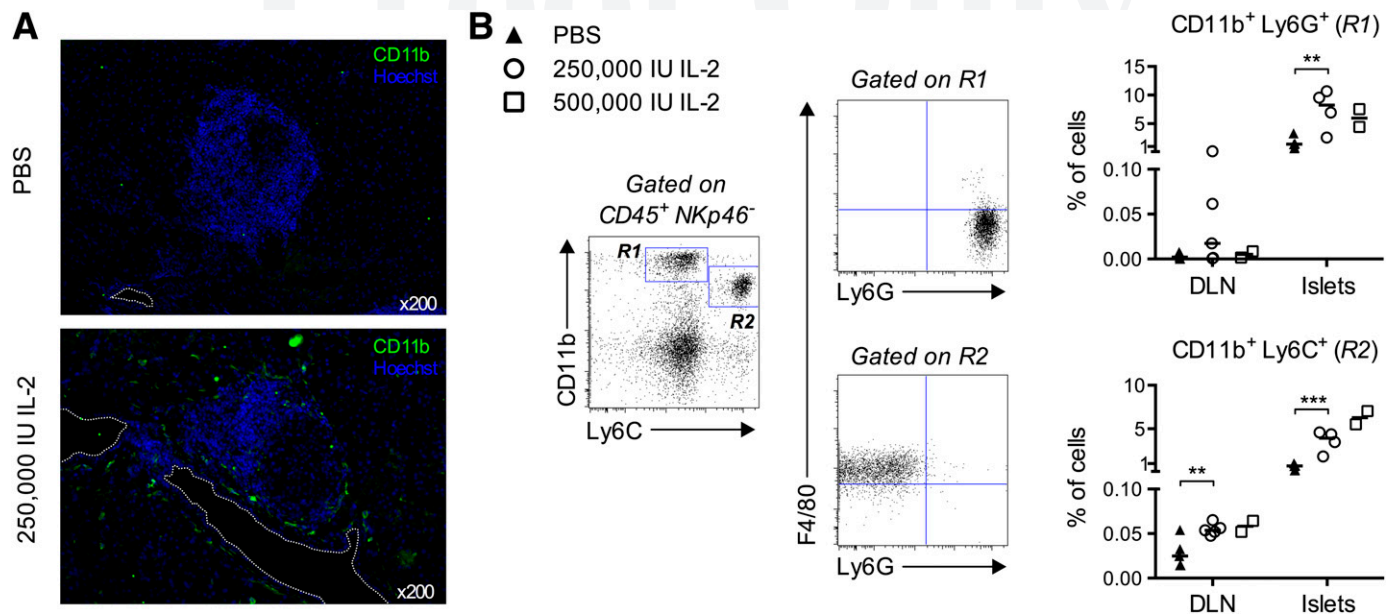


FIG. 3. Administration of high doses of IL-2 to NOD mice: effects on myeloid cells. Mice were treated as in Figure 2. **A:** Representative immunofluorescence of cryosections from the pancreas of mice treated with PBS (*top*) or 250,000 IU IL-2 (*bottom*), stained with anti-CD11b Abs (green) and Hoechst (blue) (magnification $\times 200$). Dashed line indicates blood vessels. **B:** Myeloid cell-gating strategy: islet-infiltrating cells were pregated as $CD45^+ NKp46^-$, and expression of CD11b versus Ly6C was used to define gates R1 and R2 as shown. Cells in these gates were further analyzed for the expression of F4/80 and Ly6G. Cells in gate R1 were mostly $F4/80^-$ and $Ly6G^+$, probably representing neutrophils, and cells in gate R2 were mostly $F4/80^+$ and $Ly6G^-$, probably representing tissue macrophages. **C:** Percentages of cells in gate R1 (*top*) and R2 (*bottom*) in islets, DLN, LNs, and spleen of mice in indicated treatment groups. Data are cumulative of two independent experiments with two to five mice per condition, except for A, which is from one experiment with three mice per group. Symbols represent individual mice and horizontal lines represent the median. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student t test).

percentage of T_{reg} cells (Fig. 5A), which was associated with increased cell division (Fig. 5B) and increased expression of Foxp3, CD25, GITR, ICOS, and CTLA-4 (Fig. 5C). A similar tendency was observed when low-dose IL-2 was combined with RAPA. Notably, the effect of IL-2 on T_{reg} cell numbers or activation was significantly less pronounced in the presence of RAPA (Fig. 5A–C).

Finally, we examined the effects of treatment on NK cells in the pancreas and observed that their proportion doubled after 5 days of treatment with low-dose IL-2 alone, with the percentage of proliferating cells increasing from low basal levels up to $\sim 60\%$ after treatment (Fig. 5D–E). Addition of RAPA to IL-2 treatment did not modify the effect of IL-2 on NK cells.

We discarded that the partial counteraction of IL-2 effects on T_{reg} cells by RAPA was due to interference of the JAK/STAT pathway, as IL-2-mediated STAT5 phosphorylation was not modified by the administration of RAPA in vivo (Fig. 6).

RAPA inhibits the ability of low-dose IL-2 to revert T1D. To test whether RAPA could reinforce the development of long-term tolerance when combined with IL-2, we treated new onset T1D NOD mice with 25,000 IU (low-dose) IL-2 with or without RAPA. In agreement with our previously reported results (9), low-dose IL-2 treatment induced diabetes remission in 57% of the mice. However, none of the 12 mice that received the combined treatment was cured (Fig. 7A). We assessed the effects of treatment on pancreatic T cells from these mice: RAPA/IL-2 combination did not modify the percentage of total $CD8^+$ or $CD4^+$ T cells (not shown), but it significantly increased the frequency of T_{reg} cells (Fig. 7B). Interestingly, RAPA hampered the IL-2-induced reduction in IFN- γ production by $CD8^+$ T cells infiltrating the pancreas (Fig. 7C), which

we had previously shown to be associated with T1D reversal (9). These results may partially explain why RAPA inhibits the ability of IL-2 to revert disease.

To determine whether RAPA had any effect in mice that had reverted from new-onset T1D after low-dose IL-2 therapy, we administered RAPA to NOD mice 10 days after IL-2-induced disease remission. Surprisingly, RAPA precipitated hyperglycemia in all previously cured mice (Fig. 7D). Of note, in two of eight treated mice, RAPA induced irreversible hyperglycemia, but in the other six IL-2-treated mice, the hyperglycemia triggered by RAPA was transient. Indeed, after RAPA withdrawal and without further addition of IL-2, mice spontaneously became normoglycemic again until RAPA treatment was resumed, at which point mice reversed to diabetes. In some of these mice, the transient occurrence of diabetes upon adding and removing RAPA could be repeated at least three times, indicating that RAPA can reversibly inhibit the tolerogenic effect of IL-2. We analyzed the temporal effect of RAPA on the pancreatic infiltrate. Intriguingly, T_{reg} -cell levels in the pancreas were significantly lower in mice cured from diabetes with IL-2, but which had become diabetic again after RAPA treatment compared with mice that did not receive RAPA, and a significant parallel increase in these cells was observed in the DLN (Fig. 7E and F). T_{reg} cells returned to initial levels after RAPA withdrawal and restoration of euglycemia, suggesting that under RAPA treatment the migration pattern of $CD4^+$ T cells may be altered.

The combination IL-2 plus RAPA impairs glucose tolerance. The rapid reversibility of the effect of RAPA on diabetes led us to evaluate whether RAPA was affecting glucose homeostasis. We measured fasting blood glucose levels and performed glucose tolerance tests in prediabetic NOD mice previously treated with IL-2, RAPA, or both

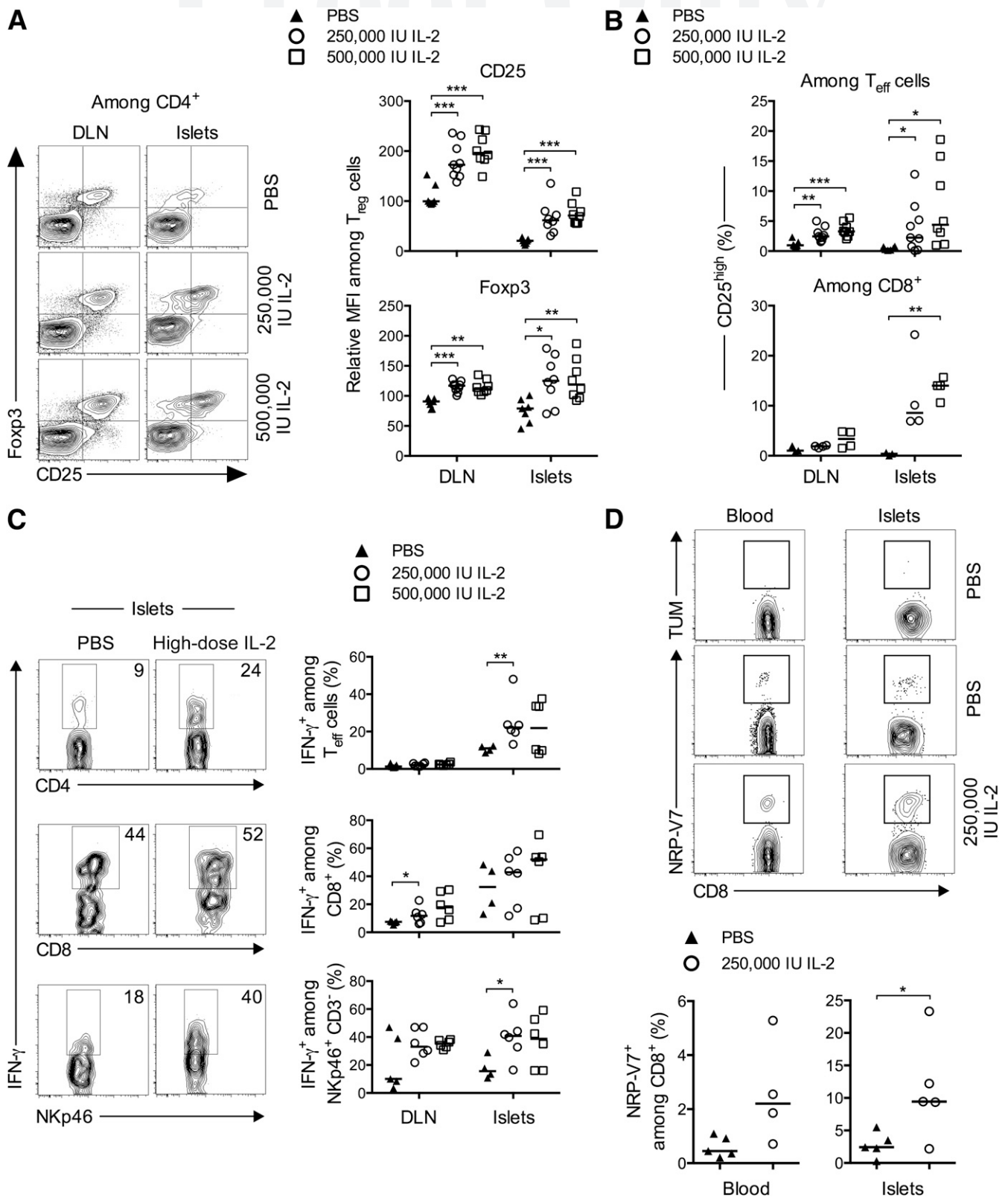


FIG. 4. Administration of high doses of IL-2 to NOD mice: effects on cell activation and cytokine production. Mice were treated as in Figure 2, and DLN and pancreas-infiltrating cells were analyzed by flow cytometry. **A, Left:** Representative contour plots of Foxp3 and CD25 expression in CD4⁺ T cells in indicated groups. **Right:** Relative mean fluorescence intensity (MFI) of Foxp3 and CD25 in T_{reg} cells expressed as the relative percentage of the MFI value in non-draining LNs of PBS-treated mice, which was assigned an arbitrary value of 100%. **B:** Percentages of CD25⁺ cells among CD4⁺ Foxp3⁺ (T_{eff} cells) (*top*) and CD8⁺ T cells (*bottom*). **C:** Representative contour plots of IFN- γ staining (*left*) and the percentage of IFN- γ -secreting cells (*right*) among islet-infiltrating CD4⁺ Foxp3⁺ (*top*), CD8⁺ (*middle*), and NK cells (*bottom*) quantified after ex vivo stimulation with PMA-ionomycin. Data are cumulative of two to three independent experiments with four to nine mice per group. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 (unpaired, two-tailed Student *t* test). **D, Top:** Representative histograms of control TUM and NRP-V7 tetramer expression on CD8⁺ T cells from blood and islets. **Bottom:** Percentage of NRP-V7⁺ CD8⁺ T cells among total CD8⁺ T cells in blood (*left*) and in the pancreatic islets (*right*). Data are from one experiment, symbols represent individual mice, and horizontal lines represent the median. **P* < 0.05 (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test).

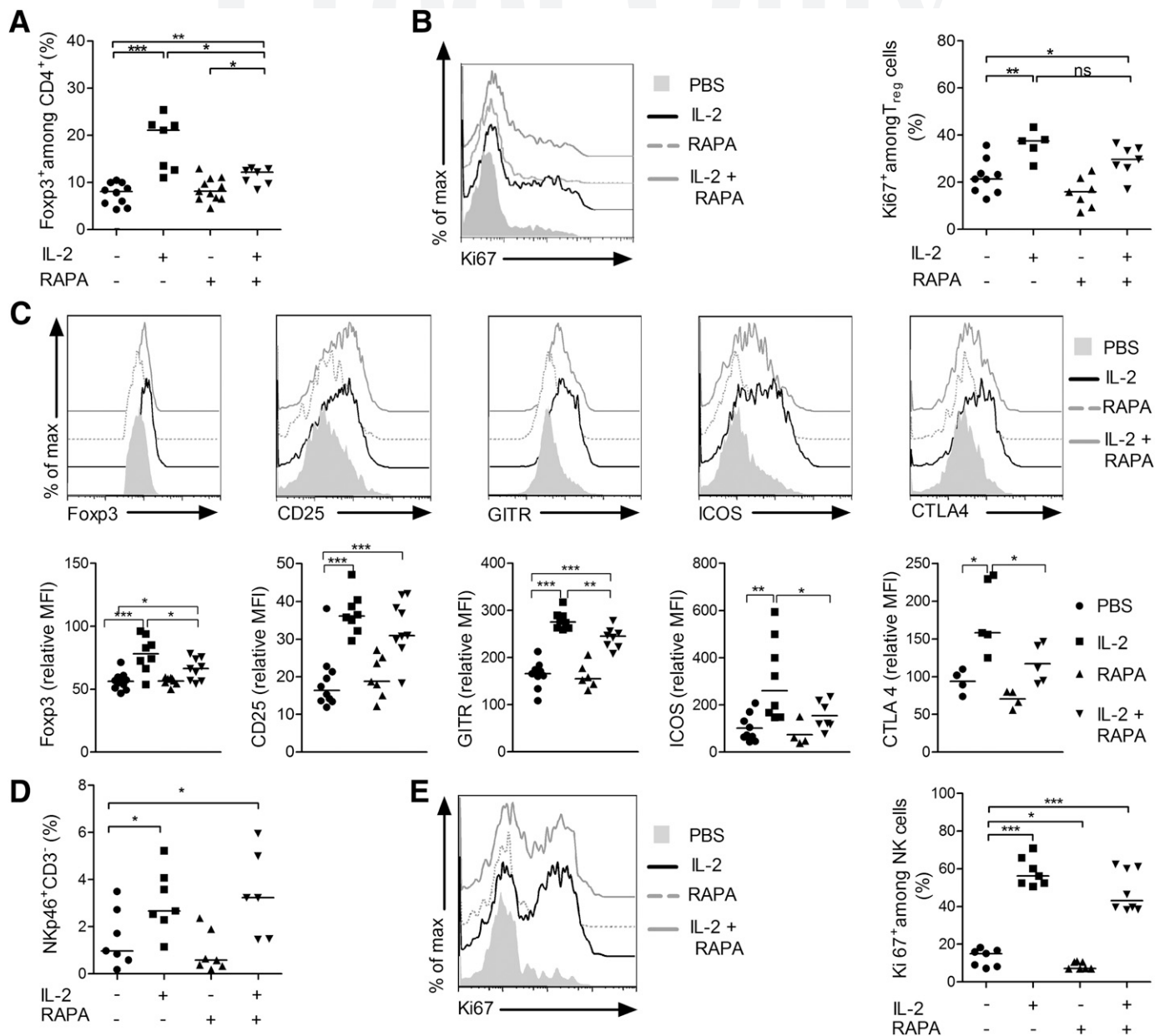


FIG. 5. Effects of combined low-dose IL-2 and RAPA on immune cells. Prediabetic female NOD mice 12–14 weeks of age were treated daily with PBS ($n = 10$), 25,000 IU IL-2 ($n = 8$), RAPA (1 mg/kg) ($n = 12$), or both ($n = 10$) over 5 days, and pancreas-infiltrating cells were collected and stained for flow cytometry analysis 2 h after the last treatment. **A:** Percentages of T_{reg} cells among CD4⁺ T cells. **B:** Representative overlay histograms of Ki67 expression (left) and percentages of Ki67⁺ T_{reg} cells (right) in indicated groups. **C:** Representative overlay histograms of Foxp3, CD25, GITR, ICOS, and CTLA-4 expression in T_{reg} cells (top) and the respective mean fluorescence intensity (MFI) (bottom) expressed as the relative percentage of the MFI value in nondraining LNs of untreated mice, which was assigned an arbitrary value of 100%. **D:** Percentages of NKp46⁺ CD3⁻ NK cells among pancreas-infiltrating cells. **E:** Representative overlay histograms of Ki67 expression (left) and percentages of Ki67⁺ NK cells (right). Data are cumulative of four independent experiments, symbols represent individual mice, and horizontal lines represent the median. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student t test).

combined. Low-dose IL-2 treatment did not modify glucose homeostasis (Fig. 8A and B), in agreement with results obtained with high doses of IL-2 (Fig. 1D). However, RAPA/IL-2 combination induced elevated fasting blood glucose levels (Fig. 8A), and also RAPA- and RAPA/IL-2-treated mice displayed highly impaired glucose tolerance (Fig. 8B). Mechanistically, RAPA-induced glucose intolerance could be due to direct β -cell toxicity or to peripheral insulin resistance; we thus monitored β -cell division and performed insulin tolerance tests (Fig. 8C and D). Even if neither RAPA nor RAPA/IL-2 treatments visibly modified the response to

an exogenous insulin boost, RAPA/IL-2 administration significantly reduced basal β -cell proliferation in vivo.

Finally, to better understand how RAPA alone or combined with IL-2 interfered with glucose homeostasis, we studied by microarray analysis the liver response to a glucose challenge. As depicted (Fig. 8E and Supplementary Fig. 1), the liver transcriptome signature was highly modified by IL-2 alone (81 genes) or combined with RAPA (40 genes), whereas fewer genes were affected by RAPA alone (16 genes). To retrieve relevant biological processes associated to the different treatments, we analyzed the canonical

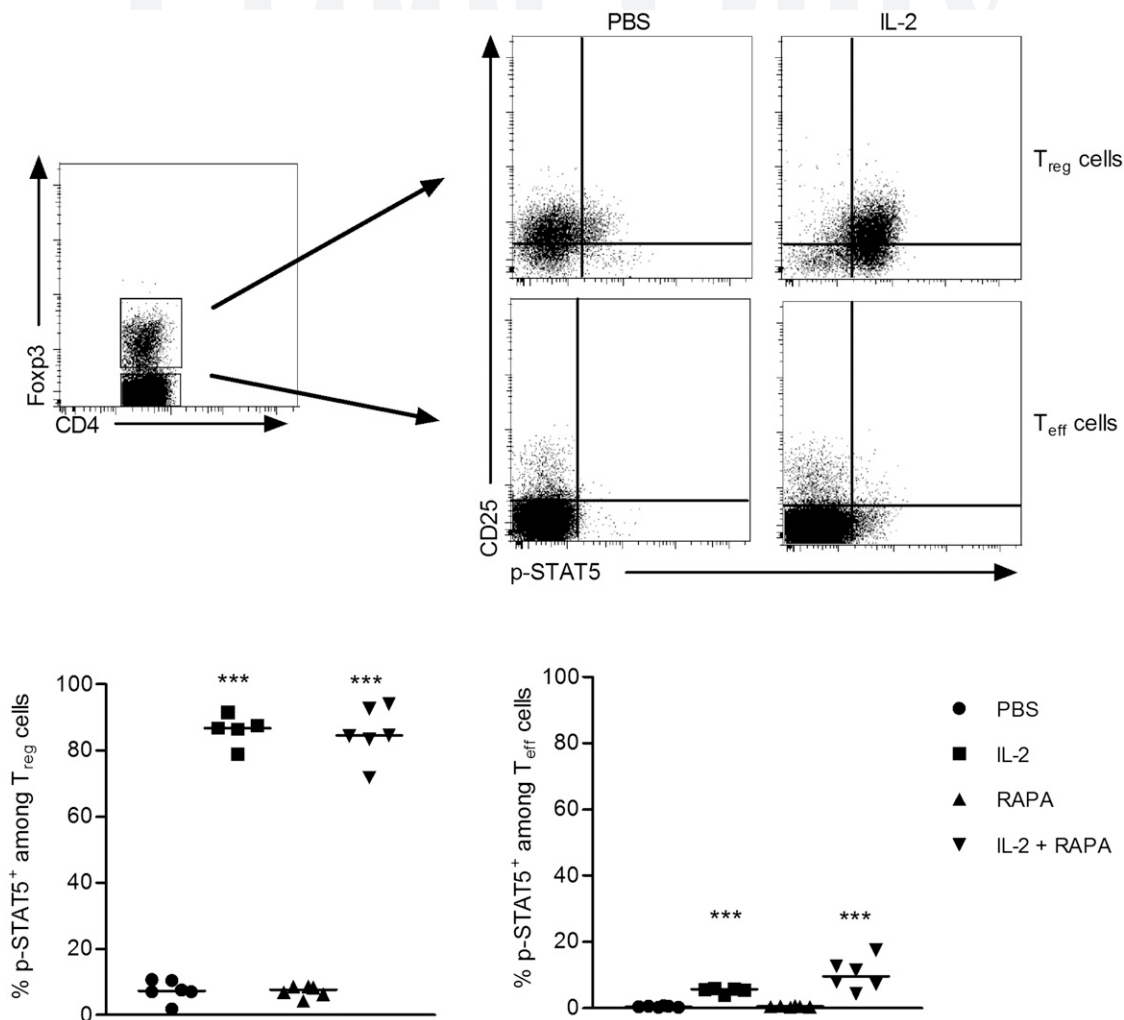


FIG. 6. IL-2 and RAPA effects on STAT5 phosphorylation. Prediabetic female NOD mice 12–16 weeks of age were injected with PBS, 1 mg/kg RAPA 16 and 2 h before analysis, 250,000 IU IL-2 (IL-2) 2 h before the analysis, or the combined treatment (IL-2 + RAPA). Phosphorylation of STAT5 on T_{reg} cells (CD4⁺ Foxp3⁺ T cells) and T_{eff} cells (CD4⁺ Foxp3⁻ T cells) was determined by flow cytometry. Shown are: the gating strategy to define the percentage of p-STAT5⁺ T_{reg} and T_{eff} cells (*top*) and the percentage of p-STAT5⁺ T_{reg} cells (*bottom left*) or T_{eff} cells (*bottom right*) in the DLN. Data are cumulative of three independent experiments, symbols represent individual mice, and horizontal lines represent the median. ****P* < 0.001 (unpaired, two-tailed Student *t* test).

pathways that were most significant to our datasets (Supplementary Table 1). RAPA- and IL-2-modified transcripts were associated mainly with metabolic and immune pathways, respectively. Interestingly, RAPA/IL-2 combination modified other pathways than each drug alone, most of them involving metabolic functions. These data further document the complex effects of these drugs beyond immune modulation and may partially explain the associated detrimental effects on glucose homeostasis.

DISCUSSION

Low-dose IL-2 administration represents one promising approach (9) (Clinical trial reg. no. NCT01353833, clinicaltrials.gov) among the novel immunotherapies being evaluated in T1D patients (4). We reasoned that we could enhance the efficiency with which IL-2 induces a tolerogenic state in NOD mice (9) by increasing its dose. However, higher IL-2 doses dramatically accelerated disease onset and demonstrated a toxicity that could even be lethal. Interestingly, female NOD mice were significantly more susceptible than males to diabetes induction, correlating

with the higher incidence of spontaneous T1D in female mice (70%) compared with male mice (30%) (22). Additionally, high-dose IL-2-associated organ edema and insulinitis appeared dissimilar in males and females, suggesting that IL-2-related side effects may be sex-dependent in the NOD mice.

T1D appeared in some of the mice treated with high-dose IL-2 despite substantial local and systemic increase in the frequency and activation of T_{reg} cells. Disease occurrence could be explained by the concurrent activation of T_{eff}, NK, B, and CD8⁺ T cells, all of which have been implicated in T1D development (3,23). Of note, among CD8⁺ T cells, islet-specific ones were enriched in the pancreas, potentially contributing to the destruction of the β cells. Remarkably, high doses of IL-2 induced a previously unreported yet striking increase in CD11b⁺ myeloid cells in the pancreas. Historically, macrophages have been regarded as mediators of insulinitis (24). However, recently myeloid cells have been associated with T1D resistance and prevention in NOD mice (19,25,26). The role of different myeloid subpopulations in disease pathogenesis is nevertheless still being largely unknown.

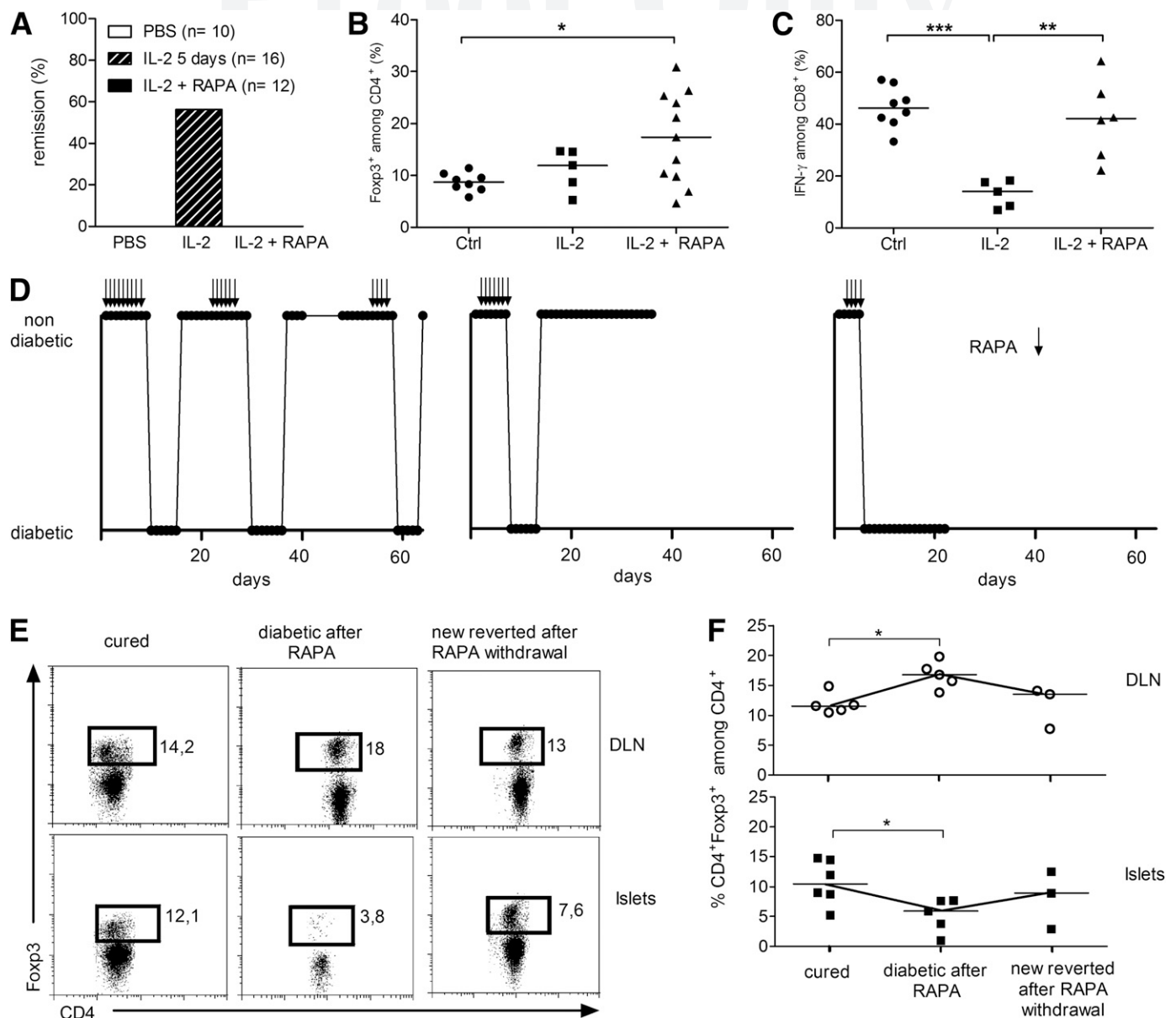


FIG. 7. RAPA abrogates IL-2-induced tolerance. New-onset diabetic NOD mice were treated daily for 5 days with PBS or 25,000 IU IL-2, or for 10 days with 1 mg/kg RAPA along with 25,000 IU IL-2. **A:** Percentage of T1D remission. **B** and **C:** Islet-infiltrating cells were analyzed 2 h after the last injection. **B:** Percentage of T_{reg} cells among CD4⁺ T cells. **C:** Percentage of IFN-γ⁺ cells among CD8⁺ T cells quantified after ex vivo restimulation with PMA-ionomycin. Symbols represent individual mice, and horizontal bars are mean values. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 (unpaired, two-tailed Student *t* test). **D:** New-onset diabetic NOD mice were cured by low-dose IL-2 and were treated with RAPA (1 mg/kg) 10 days after remission until the appearance of hyperglycemia (for 4 and up to 8 days). Arrows indicate RAPA administration. For some mice in which blood glucose levels normalized after RAPA withdrawal, a subsequent RAPA treatment was initiated after 10 days of normoglycemia, and, depending on the individual mice, this cycle could be repeated up to three times. Response to the treatment of three individual mice is shown. The term “diabetic” indicates blood glucose levels above 250 mg/dL or positive glycosuria, and “nondiabetic” indicates blood glucose levels below 250 mg/dL or negative glycosuria. **E** and **F:** The percentage of CD4⁺ Fopx3⁺ T cells among CD4⁺ cells was analyzed by flow cytometry in the DLN and the islets of individual mice at different points during treatment. **E:** Representative dot plots of Fopx3 and CD4 staining among CD4⁺ T cells. **F:** Percentage of T_{reg} cells among CD4⁺ T cells in the DLN (top) and in the islets (bottom). Symbols represent individual mice, and horizontal lines represent the median. Cured, IL-2 cured mice (*n* = 6); diabetic after RAPA, mice that became diabetic under RAPA treatment (*n* = 5); reverted after RAPA withdrawal, mice that regained normal glucose homeostasis after RAPA withdrawal (*n* = 3). **P* < 0.05 (unpaired, two-tailed Mann-Whitney test).

Overall, higher doses of IL-2 resulted in a shift from immune tolerance to overt destructive autoimmunity. In the context of human therapy, these results highlight the need to perform thorough immunomonitoring of the broad effects of IL-2 so as to determine the dose that would uniquely act on T_{reg} cells or other regulatory populations.

The potent immunosuppressive properties of RAPA are associated with its capacity to block cell cycle progression and induce T-cell anergy and depletion (27), thus impacting

on T-cell differentiation and function. In our model, RAPA specifically dampened the IL-2 effect on pancreatic T_{reg} cells. Notably, diabetic animals receiving IL-2/RAPA combination showed higher frequencies of pancreatic T_{reg} cells compared with treatment with IL-2 alone, which nevertheless were associated with inefficient control of IFN-γ production by infiltrating T cells. These T_{reg} cells could originate from the expansion of pre-existing natural T_{reg} cells or from the generation of induced T_{reg} cells from T_{eff}

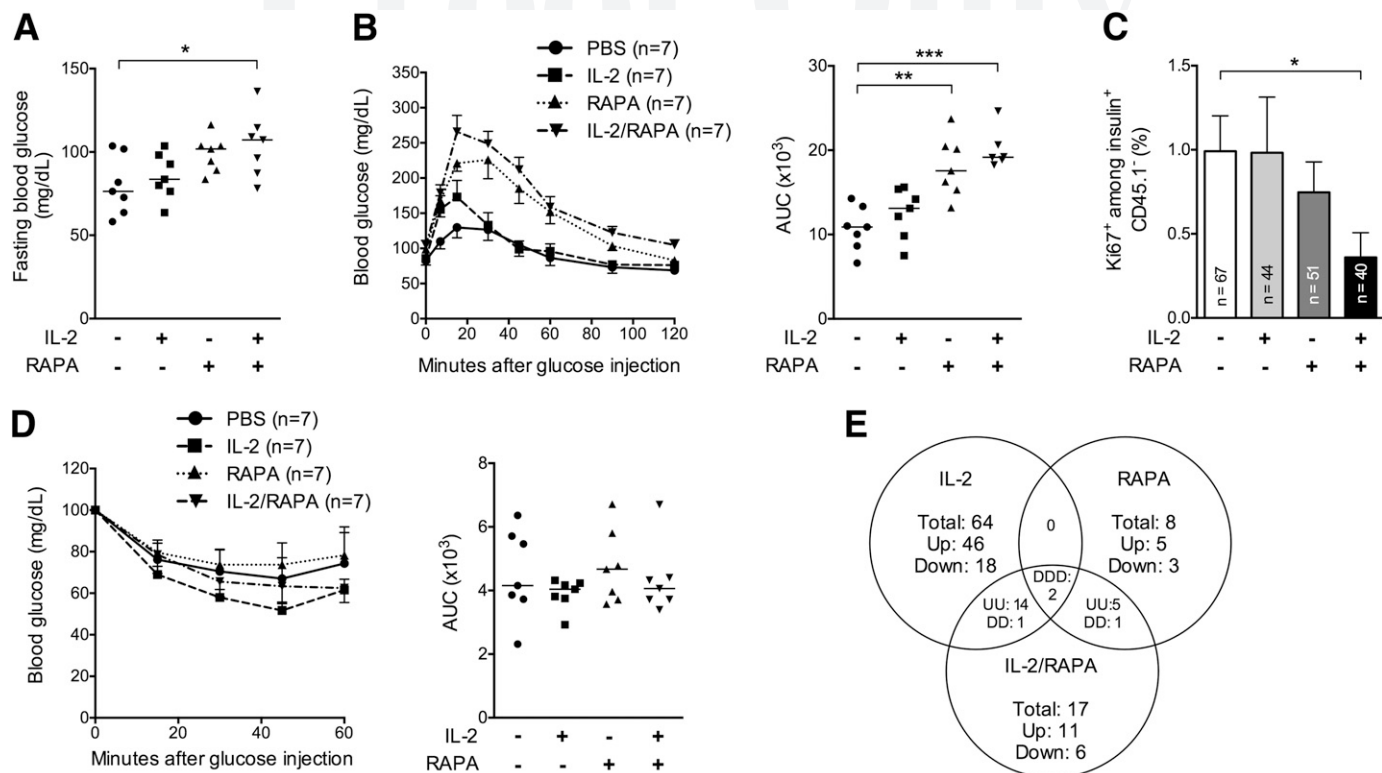


FIG. 8. A short course of RAPA alone or combined with IL-2 induces glucose intolerance. Prediabetic female NOD mice were treated for 5 days with PBS, 25,000 IU IL-2, 1 mg/kg RAPA, or IL-2 and RAPA combined. **A, B, and C:** On day 5, an IPGTT was performed after an overnight fast or mice were killed 4 h after the glucose bolus for transcriptome analysis of the liver. **A:** Fasting blood glucose levels were determined before glucose injection. **B and C:** Blood glucose levels (**B**) and area under the blood glucose curve (AUC) (**C**) of the treated mice of the different groups ($n = 7-8$ per group). Data are cumulative of two independent experiments with seven mice per group. Symbols represent individual mice, and horizontal lines represent the median. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student t test). **D:** Percentage of Ki67⁺ cells among total β cells (insulin⁺ CD45.1⁺). Each column represents the mean \pm SEM of all islets counted for all mice of the same group ($n = 3-4$ per group). * $P < 0.05$ (Mann-Whitney test). **E:** On day 5, an ITT was performed after a 4 h fast. Shown are blood glucose levels and area under the blood glucose curve of the treated mice of the different groups ($n = 7$ per group). Symbols represent individual mice, and horizontal lines represent the median. **E:** Venn diagram comparing differentially expressed genes in the liver after glucose challenge of mice in IL-2 vs. PBS, IL-2/RAPA vs. PBS, and RAPA vs. PBS groups. The threshold for differential expression was defined as 1.5-fold changes in expression with overlapping probes discarded. Each number represents the number of genes in each subgroup: total number of genes (Total), and upregulated (Up, or U) and downregulated (Down, or D) probes from reference PBS. Each dataset was derived from three biologically independent replicate samples.

cells, probably favored by the proinflammatory environment in the islets (28).

We could not attribute the deleterious impact of IL-2/RAPA combination on T_{reg}-cell function to interference of RAPA on IL-2-mediated activation of STAT-5. However, although T_{reg} cells are less dependent for survival on the AKT/mammalian target of RAPA pathway than T_{eff} cells (31), it is possible that RAPA inhibition of this pathway may still affect IL-2 action on T_{reg} cells (32,33).

NK cells have been described as having no role (34) or a pathogenic role in NOD T1D (35). In humans, they have been seen as either potentially harmful (36,37) or regulatory (38,39). Thus, their role in T1D progression is still debated. Human NK cells have been found to be significantly increased upon IL-2 administration (40,41), notably in T1D patients (33). In our model, after IL-2 administration NK cells rapidly expanded in the pancreas after IL-2 administration. Of note, the effect of IL-2 on NK cells was not affected by the addition of RAPA, raising the hypothesis that, in comparison with IL-2 monotherapy, RAPA/IL-2 combination may negatively impact on pancreatic T_{reg} cells, while failing to control IL-2-boosted NK cells. This is reminiscent of the previous observation that punctual ablation of T_{reg} cells in NOD-BDC2.5 TCR transgenic mice resulted in a fulminant form of diabetes characterized by an initial burst

in NK cell function, which led to IFN- γ -dependent activation of pathogenic T-cell populations (42).

Although our data suggest that the deleterious effects of RAPA in IL-2-treated NOD mice may be related to its action on T_{reg}-cell function or trafficking, we also found that a short course of RAPA and IL-2 at low doses significantly impaired glucose homeostasis. There have been some reports of renal transplant patients who received long-term treatment with RAPA becoming at risk for developing new-onset diabetes, associated with abnormal glucose and lipid homeostasis and with reduced insulin sensitivity (43). Furthermore, in rodents, long-term RAPA treatment severely impairs glucose tolerance, affecting hepatic gluconeogenesis (44,45), adipocyte lipid uptake (44), skeletal muscle insulin sensitivity (46), and β -cell homeostasis (44). However, RAPA alone prevents T1D development in NOD mice (13,47) and has been reported to improve T_{reg}-cell suppressive function in T1D patients (12). Here, we demonstrate that RAPA administration even for a short period and at doses two to five times lower than those reported in the literature (44,45), impaired glucose tolerance, as previously suggested (14), and modified liver glucose metabolism in the NOD model. Moreover, when combined with IL-2, the negative effects on glucose metabolism were broadened; also inducing elevated basal blood glucose levels and

impairing β -cell proliferation. Interestingly, our results showing that RAPA restored diabetes in NOD mice, which had been previously cured of new-onset disease by IL-2 treatment, evoke RAPA effects counteracting anti-CD3 treatment in NOD mice (14).

Recently, a clinical trial testing RAPA/IL-2 combined therapy in new onset T1D patients was halted due to a transient drop in C-peptide levels in all patients, despite effective T_{reg} -cell induction (33). Our results showing that RAPA breaks IL-2-induced tolerance and that, in combination with IL-2, it induces glucose intolerance, help to explain the inefficacy and deleterious consequences of the combined treatment in T1D. However, the RAPA/IL-2 combination can be efficient at boosting T_{reg} cells and inducing tolerance in graft-versus-host disease (40,48). The latter results, which were observed in hosts devoid of the metabolic alterations associated with T1D, demonstrate the different potential outcomes of the combined treatment depending on the underlying pathology. And even when referring to T1D, it is surprising to observe that the RAPA and IL-2 combination can have a completely different outcome in preventive or curative schedules in the NOD mice (13). Probably, in prediabetic mice, the effects of RAPA are not strong enough to cause hyperglycemia because, at odds with already diabetic mice, there are enough healthy islets to compensate for the negative effects of RAPA, at least for a short-term treatment.

Our results, together with the accumulated experience in the use of IL-2 and RAPA in the context of T1D prevention or reversal (see recapitulation in Supplementary Table 2), help define the limitations of the application of these drugs in T1D and may contribute to the design of improved IL-2-based therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

E.P. has received a European Foundation for the Study of Diabetes/Juvenile Diabetes Research Foundation International/Novo Nordisk 2011 grant. E.P. has received Agence Nationale de la Recherche grant ANR-09-GENO-006-01, and an INSERM/Direction Générale de l'Offre de Soins 2011 grant. O.P. has received a University of Zurich Fonds zur Förderung des Akademischen Nachwuchses grant. A.B. and L.P. were supported by the Ministère de la Recherche. E.P. is inventor of a patent application related to the use of low-dose IL-2 owned by her public institutions. No other potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

A.B., L.P., G.F., J.W., O.B., and E.P. designed and performed the experiments and analyzed data. N.C. and W.C. performed and analyzed microarray experiments. E.P. conceived the project. A.B., L.P., and E.P. wrote the paper. A.H. and all the authors discussed the results and commented on the manuscript. E.P. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

The authors thank Pere Santamaria, University of Calgary, Canada, for kindly providing the NRP-V7 and TUM tetramers, and Benoit Salomon, INSERM U959, Paris; Olivier Boyer, INSERM U905, Rouen; and José Cohen, INSERM U855, Créteil, for constructive and critical reading of the manuscript. The authors especially thank Bertrand Blondeau, UMRS 872, Paris, for his valuable advice and technical help and Pedro Carranza (supported by Cardiovascular Diseases, Diabetes and Obesity) Ile-de-France,

INSERM U959, Paris; and Hanem Sadek, INSERM U959, Paris, for technical help. The authors thank Christelle Enond, Flora Issert, François Bodin, and Serban Morosan (all from the Centre d'Exploration Fonctionnelle, Université Pierre et Marie Curie) for taking good care of the mice.

REFERENCES

1. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 1994;15:516–542
2. Sreenan S, Pick AJ, Levisetti M, Baldwin AC, Pugh W, Polonsky KS. Increased beta-cell proliferation and reduced mass before diabetes onset in the nonobese diabetic mouse. *Diabetes* 1999;48:989–996
3. Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 2010;464:1293–1300
4. Waldron-Lynch F, Herold KC. Immunomodulatory therapy to preserve pancreatic β -cell function in type 1 diabetes. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:439–452
5. Atkinson MA, Leiter EH. The NOD mouse model of type 1 diabetes: as good as it gets? *Nat Med* 1999;5:601–604
6. Chatenoud L, Thervet E, Primo J, Bach JF. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:123–127
7. Bach JF. Anti-CD3 antibodies for type 1 diabetes: beyond expectations. *Lancet* 2011;378:459–460
8. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 2008;28:687–697
9. Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010;207:1871–1878
10. Abraham RT, Wiederrecht GJ. Immunopharmacology of rapamycin. *Annu Rev Immunol* 1996;14:483–510
11. Piemonti L, Maffi P, Monti L, et al. Beta cell function during rapamycin monotherapy in long-term type 1 diabetes. *Diabetologia* 2011;54:433–439
12. Monti P, Scirpoli M, Maffi P, et al. Rapamycin monotherapy in patients with type 1 diabetes modifies CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T-cells. *Diabetes* 2008;57:2341–2347
13. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL, Shapiro AM, Rajotte RV, Power R. Combination therapy with sirolimus and interleukin-2 prevents spontaneous and recurrent autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2002;51:638–645
14. Valle A, Jofra T, Stabilini A, Atkinson M, Roncarolo MG, Battaglia M. Rapamycin prevents and breaks the anti-CD3-induced tolerance in NOD mice. *Diabetes* 2009;58:875–881
15. Cassan C, Piaggio E, Zappulla JP, et al. Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 2006;177:1552–1560
16. Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, et al. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* 2010;120:4558–4568
17. Krieg C, Létourneau S, Pantaleo G, Boyman O. Improved IL-2 immunotherapy by selective stimulation of IL-2 receptors on lymphocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:11906–11911
18. Fu W, Wojtkiewicz G, Weissleder R, Benoist C, Mathis D. Early window of diabetes determinism in NOD mice, dependent on the complement receptor CR1g, identified by noninvasive imaging. *Nat Immunol* 2012;13:361–368
19. Trudeau JD, Kelly-Smith C, Verchere CB, et al. Prediction of spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice by quantification of autoreactive T cells in peripheral blood. *J Clin Invest* 2003;111:217–223
20. Battaglia M, Stabilini A, Roncarolo MG. Rapamycin selectively expands CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells. *Blood* 2005;105:4743–4748
21. Keymeulen B, Walter M, Mathieu C, et al. Four-year metabolic outcome of a randomised controlled CD3-antibody trial in recent-onset type 1 diabetic patients depends on their age and baseline residual beta cell mass. *Diabetologia* 2010;53:614–623
22. Billiard F, Litvinova E, Saadoun D, et al. Regulatory and effector T cell activation levels are prime determinants of in vivo immune regulation. *J Immunol* 2006;177:2167–2174
23. van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011;91:79–118
24. Jansen A, Homo-Delarche F, Hooijkaas H, Leenen PJ, Dardenne M, Drexhage HA. Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice. *Diabetes* 1994;43:667–675
25. Hu C, Du W, Zhang X, Wong FS, Wen L. The role of Gr1+ cells after anti-CD20 treatment in type 1 diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol* 2012;188:294–301

26. Yin B, Ma G, Yen CY, et al. Myeloid-derived suppressor cells prevent type 1 diabetes in murine models. *J Immunol* 2010;185:5828–5834
27. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* 2009;9:324–337
28. Battaglia M, Stabilini A, Draghici E, et al. Induction of tolerance in type 1 diabetes via both CD4+CD25+ T regulatory cells and T regulatory type 1 cells. *Diabetes* 2006;55:1571–1580
29. D'Alise AM, Ergun A, Hill JA, Mathis D, Benoist C. A cluster of coregulated genes determines TGF-beta-induced regulatory T-cell (Treg) dysfunction in NOD mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:8737–8742
30. Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med* 2008;205:565–574
31. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity* 2009;30:832–844
32. Kuo CJ, Chung J, Fiorentino DF, Flanagan WM, Blenis J, Crabtree GR. Rapamycin selectively inhibits interleukin-2 activation of p70 S6 kinase. *Nature* 1992;358:70–73
33. Long SA, Rieck M, Sanda S, et al.; Diabetes TrialNet and the Immune Tolerance Network. Rapamycin/IL-2 combination therapy in patients with type 1 diabetes augments Tregs yet transiently impairs β -cell function. *Diabetes* 2012;61:2340–2348
34. Beilke JN, Meagher CT, Hosiawa K, Champsaur M, Bluestone JA, Lanier LL. NK cells are not required for spontaneous autoimmune diabetes in NOD mice. *PLoS One* 2012;7:e36011
35. Gur C, Porgador A, Elboim M, et al. The activating receptor NKp46 is essential for the development of type 1 diabetes. *Nat Immunol* 2010;11:121–128
36. Gur C, Enk J, Kassem SA, et al. Recognition and killing of human and murine pancreatic beta cells by the NK receptor NKp46. *J Immunol* 2011;187:3096–3103
37. Schleinitz N, Vély F, Harlé JR, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* 2010;131:451–458
38. Li Z, Lim WK, Mahesh SP, Liu B, Nussenblatt RB. Cutting edge: in vivo blockade of human IL-2 receptor induces expansion of CD56(bright) regulatory NK cells in patients with active uveitis. *J Immunol* 2005;174:5187–5191
39. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scrivner S, et al. Regulatory CD56 (bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:5941–5946
40. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 2011;365:2055–2066
41. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* 2011;365:2067–2077
42. Feuerer M, Shen Y, Littman DR, Benoist C, Mathis D. How punctual ablation of regulatory T cells unleashes an autoimmune lesion within the pancreatic islets. *Immunity* 2009;31:654–664
43. Johnston O, Rose CL, Webster AC, Gill JS. Sirolimus is associated with new-onset diabetes in kidney transplant recipients. *J Am Soc Nephrol* 2008;19:1411–1418
44. Houde VP, Brûlé S, Festuccia WT, et al. Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes* 2010;59:1338–1348
45. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science* 2012;335:1638–1643
46. Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* 2007;450:736–740
47. Baeder WL, Sredy J, Sehgal SN, Chang JY, Adams LM. Rapamycin prevents the onset of insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in NOD mice. *Clin Exp Immunol* 1992;89:174–178
48. Shin HJ, Baker J, Leveson-Gower DB, Smith AT, Segal EI, Negrin RS. Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* 2011;118:2342–2350

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES

Q1: Please check the affiliations carefully to confirm whether they are correct as set. There were two entries for affiliation 5, so Dr. Cagnard's affiliation was reconfigured and all subsequent affiliations were renumbered accordingly. see changes in page 1

Q2: In the sentence beginning "Anti-CD3, anti-CD4...", please confirm the definition of "ICOS". OK

Q3: In the sentence beginning "Anti-CD3, anti-CD4...", is "APC" correctly defined as "allophycocyanin"? OK

Q4: Please confirm changes made in the sentence beginning "Pancreas cells were..." No, replace pancreas cells by pancreata (2 times)

Q5: In the sentence beginning "Additionally, among the expanded...", please confirm "IGRP" as "islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein" OK

Q6: Please confirm changes made in the sentence beginning "Our results showing..." OK

Q7: Please confirm changes to the abbreviations in the support footnotes. no, O.P. should read O.B.

Q8: Original reference 18 was a duplicate of reference 17 and was therefore deleted; the remaining references were renumbered, both in the text and in the reference list. Please verify changes. OK

Q9: Original reference 27 was a duplicate of reference 19 and was therefore deleted; the remaining references were renumbered, both in the text and in the reference list. Please verify changes. OK

Q10: Reference 21 is not cited in the text. Please add an in-text citation or delete the reference. please delete

Q11: Reference 29 is not cited in the text. Please add an in-text citation or delete the reference. please delete

Q12: Reference 30 is not cited in the text. Please add an in-text citation or delete the reference. please delete

Q13: "ns" OK as defined in Fig. 1 legend? OK

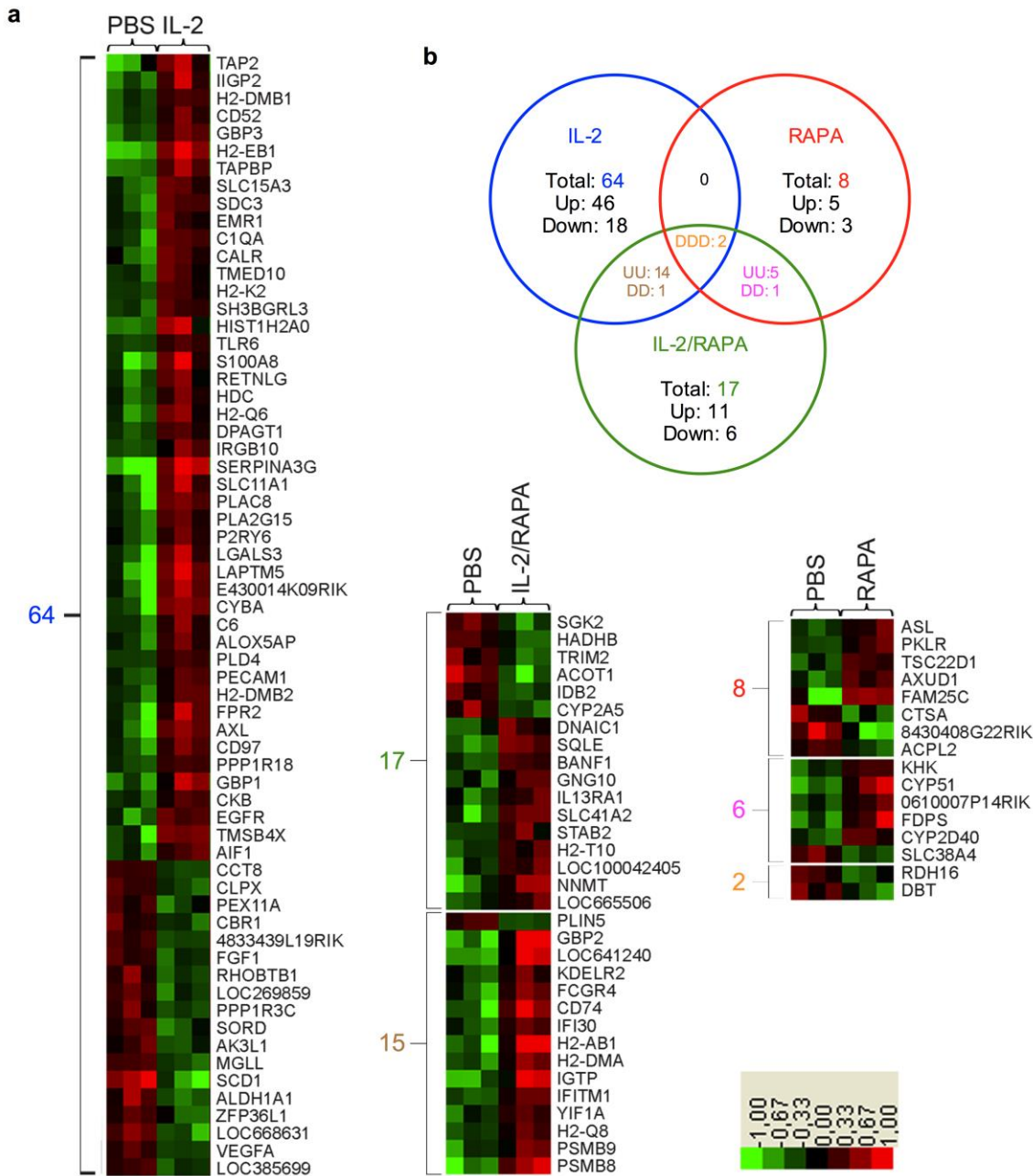
Q14: In Figure 3, only the double asterisk (**) and triple asterisk (***) are used, but in the legend the single asterisk (*) is defined in addition. May we delete the explanation of the single asterisk? OK

Q15: OK to change second citation of panel *D* to panel *E* in Fig. 5 legend? OK

Q16: Citations of panel *C* OK as added in Fig. 8?

Q17: Check that the conflict of interest information for each author is presented in full in the Acknowledgments section. OK

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. RAPA alone or combined with IL-2 impacts on liver glucose metabolism: microarray analysis. Heat maps show the genes from the comparison of IL-2 vs PBS, IL-2/RAPA vs PBS and RAPA vs PBS lists, filtered at 1.5-fold change as depicted in the Venn diagram. The intensity of green and red colors indicates the degree of down or up-regulation, respectively.

Supplementary Table 1. RAPA alone or combined with IL-2 impacts on liver glucose metabolism: pathway analysis.

		Ingenuity Canonical Pathways	-log(p-value)	Ratio	Molecules
IL-2 ONLY	Immune response	Communication between Innate and Adaptive Immune Cells	3,26E00	7,53E-02	TLR2,IL1RN,TLR6,HLA-B,HLA-DRB1,CD86,HLA-F
		Complement System	1,75E00	9,09E-02	C8B,C1QA,C6
		IL-10 Signaling	1,52E00	5,56E-02	CCR5,BLVRA,IL1RN,CHUK
		IL-8 Signaling	2,33E00	4,69E-02	PLD4,VEGFA,RAC2,ARRB2,RHOG,CHUK,IQGAP1,FNBP1,EGFR
		Interferon Signaling	2,57E00	1,18E-01	OAS1,IFITM1,PSMB8,STAT1
		Lipid Antigen Presentation by CD1	1,37E00	9,09E-02	CALR,PDIA3
		NF-κB Signaling	1,63E00	4,12E-02	SIGIRR,TLR2,TGFBR2,IL1RN,TLR6,CHUK,EGFR
		Toll-like Receptor Signaling	2,59E00	8,77E-02	SIGIRR,TLR2,PPARA,TLR6,CHUK
	Metabolism	Lipoate Biosynthesis and Incorporation II	1,46E00	5E-01	LIAS
		PXR/RXR Activation	1,63E00	6,25E-02	PPARA,SCD,ALDH1A1,NR1I2
		Sorbitol Degradation I	1,76E00	1E00	SORD
		Sucrose Degradation V (Mammalian)	2,23E00	2,86E-01	ALDOB,GALM
		Superpathway of Citrulline Metabolism	1,62E00	1,43E-01	ASL,ARG1
RAPA ONLY	Metabolism	PI3K/AKT Signaling	1,83E00	2,96E-02	HSP90B1,NFKBIA,HSP90AB1,EIF4EBP1
		4-hydroxyproline Degradation I	1,81E00	5E-01	ALDH4A1
		Acetyl-CoA Biosynthesis I (Pyruvate Dehydrogenase Complex)	1,34E00	1,67E-01	DBT
		Arginine Degradation I (Arginase Pathway)	1,51E00	2,5E-01	ALDH4A1
		Ceramide Biosynthesis	1,34E00	1,67E-01	KDSR
		Citrulline-Nitric Oxide Cycle	1,42E00	2E-01	ASL
		NAD Biosynthesis from 2-amino-3-carboxymuconate Semialdehyde	1,34E00	1,67E-01	QPRT
		PPAR Signaling	1,48E00	3E-02	HSP90B1,NFKBIA,HSP90AB1
		PPARα/RXRα Activation	1,41E00	2,31E-02	ADCY9,HSP90B1,NFKBIA,HSP90AB1
		Proline Degradation	1,81E00	5E-01	ALDH4A1
		S-methyl-5-thio-α-D-ribose 1-phosphate Degradation	1,81E00	5E-01	APIP
IL-2/RAPA ONLY	Metabolism	1D-myo-inositol Hexakisphosphate Biosynthesis V (from Ins(1,3,4)P3)	1,47E00	3,33E-01	IPMK
		Acetone Degradation I (to Methylglyoxal)	1,46E00	7,69E-02	CYP2A13/CYP2A6,CYP51A1
		Epoxysqualene Biosynthesis	1,65E00	5E-01	SQLE
		Fatty Acid β-oxidation I	1,37E00	6,9E-02	HADHB,SLC27A2
		Isoleucine Degradation I	1,97E00	1,43E-01	HADHB,ACADSB
		L-serine Degradation	1,47E00	3,33E-01	SRR
		Stearate Biosynthesis I (Animals)	2,25E00	9,38E-02	SLC27A2,DBT,ELOVL1
		Superpathway of Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis I (via Mevalonate)	1,86E00	1,25E-01	FDPS,HADHB

		Tryptophan Degradation III (Eukaryotic)	1,76E00	1,11E-01	HADHB, HAAO
SHARED IL-2 AND IL-2/RAPA	<i>Immune response</i>	Antigen Presentation Pathway	6,78E00	1,75E-01	PSMB9, HLA-DMA, HLA-B, HLA-DMB, PSMB8, CD74, TAPBP
		CD28 Signaling in T Helper Cells	1,4E00	3,28E-02	CD3G, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB1
		CTLA4 Signaling in Cytotoxic T Lymphocytes	1,72E00	4,21E-02	CD3G, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB1
		Calcium-induced T Lymphocyte Apoptosis	3,3E00	8,2E-02	CD3G, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB1, PRKD3
		Dendritic Cell Maturation	1,35E00	2,6E-02	HLA-DMA, HLA-B, HLA-DMB, HLA-DQB1, FCGR3A
		IL-4 Signaling	2,02E00	5,33E-02	HLA-DMA, IL13RA1, HLA-DMB, HLA-DQB1
		Nur77 Signaling in T Lymphocytes	2,58E00	7,02E-02	CD3G, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB1
		OX40 Signaling Pathway	3,45E00	8,2E-02	CD3G, HLA-DMA, HLA-B, HLA-DMB, HLA-DQB1
		PKCθ Signaling in T Lymphocytes	1,4E00	3,15E-02	CD3G, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB1
		Role of NFAT in Regulation of the Immune Response	1,92E00	3,23E-02	CD3G, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB1, FCGR3A, GNG10
		T Helper Cell Differentiation	1,39E00	4,35E-02	HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB1
		iCOS-iCOSL Signaling in T Helper Cells	1,53E00	3,57E-02	CD3G, HLA-DMA, HLA-DMB, HLA-DQB1
	<i>Metabolism</i>	NAD biosynthesis II (from tryptophan)	2,04E00	1,54E-01	HAAO, QPRT
		Triacylglycerol Biosynthesis	3,3E00	1,21E-01	PPAPDC1B, AGPAT2, DBT, ELOVL1
		Valine Degradation I	2,99E00	1,67E-01	HADHB, ACADSB, DBT
SHARED RAPA AND IL-2/RAPA	<i>Metabolism</i>	Branched-chain α-keto acid Dehydrogenase Complex	1,35E00	2,5E-01	DBT
		Cholesterol Biosynthesis I	3,42E00	2,31E-01	SQLE, NSDHL, CYP51A1
		Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol)	3,42E00	2,31E-01	SQLE, NSDHL, CYP51A1
		Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol)	3,42E00	2,31E-01	SQLE, NSDHL, CYP51A1
		Geranylgeranyldiphosphate Biosynthesis	1,35E00	2,5E-01	FDPS
		Superpathway of Cholesterol Biosynthesis	4,93E00	1,85E-01	FDPS, SQLE, HADHB, NSDHL, CYP51A1
		Trans, trans-farnesyl Diphosphate Biosynthesis	1,35E00	2,5E-01	FDPS
		Triacylglycerol Biosynthesis	3,3E00	1,21E-01	PPAPDC1B, AGPAT2, DBT, ELOVL1
		Zymosterol Biosynthesis	2,73E00	3,33E-01	NSDHL, CYP51A1

Supplementary Table 1. RAPA alone or combined with IL-2 impacts on liver glucose metabolism: pathway analysis. The table shows the top canonical pathways, identified from the Ingenuity canonical pathways library that were most significant to the data sets filtered at 1.2-fold change (see figure 6). Relevant pathways were obtained according to the following 2 criteria: 1) Fischer's exact test was used to calculate a p-value determining the probability that the association between the genes in the dataset and the canonical pathway is explained by chance alone ("Log(Pvalue)"); and 2) A ratio of the number of genes from the data set that map to the pathway divided by the total number of genes that map to the canonical pathway is displayed ("Ratio"). "Molecules" show the genes from the data set included in the corresponding canonical pathway. Pathways were hand-cured and classified as immune (immune response) or metabolic (metabolism) pathways. Data are from one experiment with 3 biological replicates for each condition.

Role of cytokines in thymus- versus peripherally derived-regulatory T cell differentiation and function

Jérémy D. Goldstein^{1,2,3#†}, Louis Pérol^{4,5,6#}, Bruno Zaragoza^{1,2,3}, Audrey Baeyens^{1,2,3}, Gilles Marodon^{1, 2,3#} and Eliane Piaggio^{4,5,6#*}

¹Université Pierre et Marie Curie Univ Paris 06,

²Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7211,

³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U 959, Immunology-Immunopathology-Immunotherapy (I3), 75013 Paris, France

⁴INSERM U932, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

⁵Institut Curie, Section Recherche, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

⁶INSERM Center of Clinical Investigation (CBT507 IGR-Curie), 75005 Paris, France

These authors contributed equally to this work

* Corresponding author: eliane.piaggio@yahoo.com Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 932, 26 rue d'Ulm, 75005 Paris, France

†Current address: Institute of Research in Biomedicine, Department of Cellular Immunology, Bellinzona, Switzerland.

Word count : 2972

Running title: Role of cytokines on tTreg and pTreg biology

Abstract

CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) are essential players in the control of immune responses. Recently, accordingly to their origin, two main subsets of Tregs have been described: thymus-derived Tregs (tTregs) and peripherally derived Tregs (pTregs). Numerous signaling pathways including the IL-2/STAT5 or the TGF- β /Smad3 pathways play a crucial role in segregating the two lineages. Here, we review some of the information existing on the distinct requirements of IL-2, TGF- β and TNF- α three major cytokines involved in tTreg and pTreg generation, homeostasis and function. Today it is clear that IL-2 is mandatory for proper differentiation of tTregs and is essential for tTreg and pTreg survival in the periphery, which are exquisitely sensitive to this cytokine. This notion has led to the development of promising therapeutic strategies based on low-dose IL-2 administration to boost the patients' own Treg compartment and dampen autoimmunity and inflammation. Also, solid evidence points to TGF- β as the master regulator of pTreg differentiation and homeostasis. However, therapeutic administration of TGF- β is difficult to implement due to toxicity and safety issues. Knowledge on the role of TNF- α on the biology of Tregs is fragmentary and inconsistent between mice and humans. Moreover, emerging results from the clinical use of TNF- α inhibitors indicate that part of their anti-inflammatory effect may be dependent on their action on Tregs. Given the profusion of clinical trials testing cytokine administration or blocking to modulate inflammatory diseases, a better knowledge of the effects of cytokines on tTregs and pTregs biology is necessary to improve the efficiency of these immunotherapies.

Thymus-derived Tregs (tTregs), which emerge from the thymus as a distinct lineage, and peripherally derived Tregs (pTregs), which are generated outside the thymus from CD4⁺CD25⁻ T cell precursors under particular conditions of stimulation, present great similarities and differences. They are both defined by the expression of the transcription factor Foxp3, widely recognized as the master regulator of Treg fate. This factor, expressed quite specifically by Tregs (1, 2) is required for their suppressive function both in vitro and in vivo (1-3). But Tregs' specific genetic signature is only partially dependent on Foxp3 (4-8). And, in order to acquire this exclusive signature and mature into a stable lineage, both tTregs and pTregs will go through a process of “education” in several steps and different localizations. Here, we will describe the role of cytokines during this process. The role of the TCR and of the antigen in Treg development has been the subject of a recent excellent review (9) and will not be extensively discussed here.

1. Thymic derived Treg cells

tTregs have been defined by the constitutive expression of the high affinity IL-2R α chain, CD25 (10). They are selected in the thymus based on their recognition of self-antigens by a TCR of high avidity (11) and represent an important fraction of the total Tregs found in periphery (12, 13). Removal of the thymus early after birth leads to various auto-immune symptoms (14), suggesting that tTregs participate in the continuous prevention of spontaneous auto-immunity.

1.1. IL-2 and IL-15 play an essential role in tTreg differentiation

The role of IL-2 in tTreg differentiation and homeostasis has been extensively studied. Early work showed that mice deficient for IL-2 or CD25 were profoundly deprived of Tregs in the periphery but not in the thymus (15, 16), suggesting that IL-2 was mandatory for Treg homeostasis in the periphery but not for thymic generation. However, mice doubly deficient for IL-2 and IL-15, or for the IL-2R β chain (CD122) common to IL-2 and IL-15, present a quasi-complete depletion of thymic Treg cells (17, 18). Consequently, the CD122 signaling is mandatory for proper differentiation of tTregs. At the molecular level, binding of the CD122 signaling intermediate STAT5 to the conserved non-coding DNA sequence 2 (CNS2) element at the *Foxp3* locus is required for optimal Foxp3 expression (17, 19-21). Demethylation of the CNS2 is the hallmark of stable Tregs but the role played by IL-2 in this process appears minimal since IL-2 cannot drive demethylation of the CNS2 in CD25^{hi}Foxp3⁻ tTreg precursor if applied in the absence of TCR signals (22). Indeed, this precursor population expresses Foxp3 in vitro upon IL-2 stimulation without requirement for additional TCR signaling (23). Thus, a two-step model for Treg differentiation has been proposed in which TCR/CD28 signals first induce the differentiation of this precursor with enhanced sensitivity to IL-2/IL-15, followed by direct Foxp3 induction by IL-2/IL-15 signaling in a STAT5-dependent TCR-independent manner (23, 24). However, we believe that this two-step model is incomplete. Indeed, we have recently demonstrated that a minority of tTreg precursors expressed pSTAT5 ex vivo in unmanipulated neonates and we propose that this subset might be the direct precursors of pSTAT5⁺ CD25⁺Foxp3⁺ tTregs (25). Nevertheless, the fact that not all Foxp3⁺ T cells express pSTAT5 suggests the existence of a STAT5-independent pathway of differentiation for tTreg. Thus, the exact mechanism by which CD122 signaling controls the generation of tTregs remains to be determined.

1.2. No IL-2, no tTregs in the periphery

Results obtained in mice deficient for IL-2 (26, 27) or its receptor (28, 29), which develop extensive lymphadenopathy and die of systemic autoimmunity early after birth, extended the role of IL-2 from a “T-Cell Growth Factor” (30) to “the gatekeeper of immunological tolerance”. The autoimmunity observed in IL-2/IL-2R KO mice is associated with a profound deficit in Treg numbers and function, indicating that tTregs generated in the absence of IL-2/IL-2R signaling cannot survive in the periphery. Furthermore, in vivo neutralization of IL-2 by the injection of an anti-IL-2 antibody results in the rapid depletion of Tregs and in the appearance of systemic, albeit limited, auto-immunity (31). IL-2 is required for the maintenance of Foxp3 protein and mRNA expression both in vitro and in vivo (31-34). Furthermore, Tregs are crucially dependent on paracrine IL-2 production by effector T cells (Teffs), as they cannot produce IL-2 due to direct Foxp3-mediated repression of IL-2 transcription (35). Worth mentioning, the number of Tregs is indexed to the number of IL-2 producing Teffs (36). In addition, polymorphisms in IL-2, CD25 or IL-2R downstream adaptors genes are associated with impaired Treg numbers or function and higher susceptibility to autoimmunity (37-40). Indeed, we and others have shown that IL-2 administration to mice (41-45) and humans (46, 47) increases Treg numbers, reinforce their suppressive function and protects from chronic inflammation. The demonstration that IL-2 is critical for Treg biology has opened new perspectives for the treatment of inflammatory diseases.

1.3. A more uncertain role for TGF- β and TNF- α on tTreg development

The role of TGF- β during tTreg differentiation is controversial. Mice deficient for TGF- β (48, 49) or for either one subunit of its receptor (50-54) develop a lethal autoimmune syndrome associated with a deficit in Tregs (36, 48, 52-55). Interestingly, this syndrome is only seen if TGF- β is silenced early in T cell differentiation, suggesting that besides a deficit in tTreg, lymphopenia is an additional trigger of autoimmunity in the absence of TGF- β signaling (56). At the molecular level, TGF- β triggers the binding of Smad3/NFAT complex on the promoter and on the CNS1 enhancer regions of the Foxp3 gene (57). However, mice deficient for CNS1 have no alteration in tTreg differentiation (58), suggesting that TGF- β is not required for this process. But mice deficient for both TGF- β and IL-2 are completely deprived of tTregs (53), suggesting that TGF- β might compensate a defect in IL-2 and induce Foxp3 expression. How and when IL-2 and TGF- β signaling pathways intersect in the thymus to generate Foxp3⁺ cells remains to be fully elucidated.

TNF- α , a pleiotropic cytokine, already known for its pro-inflammatory capacity, can modulate autoimmunity partially by acting on Tregs through the type II TNFR (TNFR2) (59). Interestingly, TNFR2 KO or TNFR2 ligands-deficient (TNF- α /LT- α /LT- β) triple KO mice show a decrease of Tregs in the thymus (59), suggesting that TNF could also act on tTreg development. These results need however to be interpreted with caution since lymphopenia per se or alterations of the thymic stromal architecture might affect Treg generation. Further elucidation of the role of TNF- α and TNF receptors awaits the generation of mice with conditional ablation of TNF receptors in the Treg lineage.

2. Peripheral Tregs

The group of J. Lafaille was among the first to described pTregs in 2002. They showed that the transfer of CD4⁺ spleen T cells could prevent EAE in an IL-2-dependent process involving the differentiation of CD4⁺CD25⁺ Tregs from CD4⁺CD25⁻ T cell precursors (60). Induced from naïve CD4⁺ T cells in the periphery, pTregs present a distinct and broader

TCR repertoire than tTreg (61, 62). Indeed, pTreg differentiation mainly occurs in the context of bacterial or viral infection (63-65), in tumors (66, 67) or in mucosal tissues notably in a context of oral tolerance (13, 68-70). A recent study suggested that pTreg main function would be the prevention of mucosal Th2-mediated immunity, notably in the gastrointestinal tract and lungs (13). pTregs would also be involved in the induction of tolerance to commensal microbiota (13, 70).

The differentiation of pTregs requires antigenic stimulation in a defined anti-inflammatory environment, process orchestrated in part by dendritic cells (DC). Several DC subsets have been associated with pTreg induction (71), including plasmacytoid DC (72, 73) and CD103⁺ DCs, which following education by retinoic acid (RA) differentiate into tolerogenic DC, mainly in the intestine (68, 70). H. Von Boehmer's group showed that targeting the antigen towards DCs through DEC205 recognition induced the conversion of CD4⁺ naïve T cells into CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ pTreg (74). This induction was shown to be dependent on TGF- β (75). Indeed, mice deficient for TGF- β in Langerhans cells (a specialized subset of DC in the skin) develop signs of skin auto immunity (76). The role of IL-2 or TNF- α produced by DC in the induction of pTreg remains to be fully elucidated.

2.1. TGF- β is the master regulator of pTreg differentiation and homeostasis

The differentiation of pTregs from CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ naïve T cells requires TGF- β . Initial studies showed that *in vitro* treatment of murine or human CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ naïve T cells with TGF- β induced Foxp3 expression in these cells and conferred a suppressive function (77, 78). Then, a mandatory role for TGF- β in pTreg differentiation has been demonstrated *in vivo* (48, 54, 68, 70), notably in the context of oral tolerance (63). In addition, mice deficient for the TGF- β -sensitive CNS1 enhancer do not present any differentiation of pTregs (13, 58) confirming the essential role of TGF- β in pTreg induction. Interestingly, *in vivo* pTregs differentiation by TGF- β can occur both in physiological (68, 70) and pathological (79) situations.

Two kinds of regulators of pTreg differentiation can be distinguished. First, those that interfere with TGF- β signaling like TNF- α (56), or those that induce PI3K signaling. Of importance, the PI3K/Akt/mTOR pathway is a strong inhibitor of Foxp3 expression, which prevents both tTreg and pTreg differentiation (80, 81). Consistent with these observations, a very recent study demonstrated that pTreg differentiation cannot occur in presence of the C3a or C5a signaling pathway. This pathway blocks Foxp3 production by induction of PI3K signaling and repression of TGF- β expression (82). Second, pTreg differentiation can be improved by molecules that increase TGF- β signaling (83), like CTLA-4 (84). Thus, modulating TGF- β or PI3K signaling in the periphery might represent a promising approach to tip the balance in favor of pTreg.

Of importance, TGF- β has a dual and opposite role in the immune system: it participates not only in the generation of pTregs, but also, in conjunction with IL-6 or IL-4, it induces the differentiation of pro-inflammatory Th17 cells or Th9 cells, respectively (85, 86). Consequently, TGF- β administration could aggravate inflammation and autoimmunity. Moreover, TGF- β pleiotropic effects outside the immune system and toxicity limit its therapeutic application (87) and systemic administration of TGF- β has been rapidly abandoned by the pharmaceutical industry (88). Nevertheless, therapeutic approaches that induce TGF- β production and pTreg differentiation may represent safer and efficient future therapies.

2.2. IL-2 signaling is mandatory for pTreg differentiation, homeostasis and stability

Although IL-2 by itself is not sufficient to generate pTregs, it seems to be critical for the development of functional CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ pTregs induced by TGF- β (77, 89, 90). Indeed, addition of a neutralizing anti-IL-2 antibody to the culture strikingly abolishes the induction of Foxp3, and IL-2^{-/-} or Stat5^{-/-} naïve T cells are unable to generate pTregs (20, 89-91). Interestingly, the role of IL-2 is non-redundant, as other common gamma chain receptor (CD132)-using cytokines cannot restore pTreg generation in IL-2^{-/-} T cells (89, 90). Likewise, the group of D. Horwitz reported that IL-2 also potentiates pTreg suppressive function and expression of key Treg-signature molecules such as CTLA-4, GITR and CD122 (90). Different mechanisms have been proposed to explain IL-2 action in the TGF- β mediated induction system: sustained Foxp3 expression via JAK3/STAT5 signaling (92), enhancement of proliferation and survival of newly generated pTregs, or increased conversion of latent to active TGF- β via the urokinase receptor pathway (93, 94).

In the case of lymphopenic recipients, the generation of pTregs upon transfer of naïve T cells seems dependent on IL-2 production by activated T cells (95). Along these lines, low-dose IL-2 injection into irradiated recipients of allogeneic T cells increases the generation of donor-derived pTregs (96). However, the specific contribution of tTregs and pTregs to the Treg increase induced by exogenous IL-2 administration to lympho-replete mice is not known (42-44). We approached this question by adoptively transferring CD4⁺GFP⁻(Foxp3⁻)T cells into wild-type NOD mice treated with IL-2 (Figure 1). We observed that IL-2 administration increases endogenous Treg proportions, but is unable to induce Foxp3 expression in the transferred cells, even in the pancreas, where auto-antigen encounter is likely to provide enough TCR and co-stimulation signals. These data suggest that at least in this model, exogenous IL-2 acts mainly by expanding tTregs.

In vitro and in vivo recently differentiated pTregs present unstable Foxp3 expression (97, 98), which can be lost in an inflammatory context, giving rise to “ex-Tregs” producing pro-inflammatory cytokines (99). Importantly, in most of the studies describing Foxp3 instability, Tregs were put in an environment lacking IL-2 (43, 99-101). However, IL-2 administration could prevent the conversion of Tregs (43, 99-101). Furthermore, unstable pTregs are exclusively located in the CD4⁺CD25⁻Foxp3^{low} compartment and, upon time and “education”, they acquire increased CD25 and Foxp3 expression as well as a demethylated CNS2 – a well known marker of Treg stability (97, 98, 102, 103). Also, IL-2 could prevent conversion of recently differentiated pTregs by the induction and regulation of GATA3 expression (104, 105). Taken together, all these studies suggest that IL-2 plays an important role in the “education” of pTregs. However, further studies are required to determine the additional factors involved in the stability of the Treg lineage.

2.3. The emerging role of TNF- α in pTreg homeostasis and function

Data on the effect of TNF- α on Treg function are fragmented and sometimes controversial. In vitro, TNF- α increased tTreg proliferation in the presence of IL-2, associated with Foxp3 upregulation in mice (106). Also, TNF- α increased the expression of receptors of the TNF super family, such as TNFR2, 4-1BB, and OX40 (107), and TNF- α -induced proliferation of Tregs involved the TNFR2 pathway (59, 108) (and our unpublished data). In addition, it has been described that pre-incubation of Tregs with TNF- α can improve their in vitro suppressive function (106). However, Tregs obtained from WT or TNFR2^{-/-} mice appear to have similar in vitro suppressive activity (109) (our unpublished data). At odds with mice results, TNF- α seems to reduce Treg suppressive function in humans (106, 110-112).

The main issue of these experiments is that TNF- α can act on both Treg and Teff populations and that activated Teffs, which express TNFR2, are less sensitive to Treg-mediated suppression (113).

In vivo, the stimulatory effect of TNF- α on Tregs has been demonstrated in different conditions. We have recently shown that in vivo, activated Teffs can boost Treg proliferation and suppressive function, partly by a TNF- α -mediated mechanism (114). It has also been shown that TNF- α could improve Treg proliferation and accumulation in mouse models of caecal ligation puncture, colitis and cancer (59, 106, 108). Moreover, the fact that TNF- α ^{-/-} LT α ^{-/-}LT β ^{-/-} and TNFR2^{-/-} mice possess less Tregs in the periphery supports the idea that TNF- α , like IL-2, plays a role in Treg homeostasis (59, 108). However, neither TNF- α ^{-/-} nor TNFR2^{-/-} mice develop spontaneous autoimmunity, and Tregs recovered from these mice express the same level of Foxp3 (59). Nevertheless, as the lack of TNFR2 expression on Teffs could impact on their pathogenic capacity, it is difficult to evaluate the individual contribution of the TNF- α -TNFR2 pathway to Treg and Teff function. Interestingly, recent work using transfer of highly purified WT or TNFR2^{-/-} Tregs in RAG^{-/-} mice suggests that colitis suppression could be dependent on TNFR2 expression by Tregs in vivo (59, 115). Interestingly, H. Clark et al point out that pTregs, contrary to tTregs, may not require TNFR2 expression to suppress in vivo. However, TGF- β pre-incubation can render tTregs from TNFR2^{-/-} mice as efficient as WT cells, suggesting that in this study, the implication of TNFR2 in the suppressive capacity of pTregs may be hidden by the TGF- β pre-incubation (115). Collectively, these data point to an important role of signaling through TNFR2 in the suppressive function of Tregs in vivo.

In humans, TNF- α has been implicated in the physiopathology of autoimmune diseases and consequently anti-TNF- α treatments (antibodies or soluble receptor) have been used with successful results obtained in Crohn's disease and rheumatoid arthritis (116). Interestingly, beyond dampening TNF- α 's pro-inflammatory effect, anti-TNF- α treatment has been associated with an accumulation of Tregs (117) and with improved Treg function (111, 117, 118). Likewise, a recent study showed that TNF- α present in the synovial fluid of RA patients reduced Treg suppressive function and this effect was lost in anti-TNF- α treated patients (119). However, increased frequencies of Tregs, could be alternatively explained by a relative reduction of the activated Foxp3⁺ cells without a direct change in Treg homeostasis. Indeed, in mice transgenic for human TNF- α , which develop spontaneous arthritis, both pools of Teffs and Tregs decrease during the disease course and increase during anti-TNF- α treatment (120). Otherwise, it could be possible that TNF- α exposure may hamper pTreg induction. It is not clear whether the accumulated Tregs observed after anti-TNF- α treatment are tTreg or pTreg. Then, it could be possible that TNF- α may have a negative effect on the induction of pTreg cells that would be removed during anti-TNF- α administration. Indeed, it was shown that blocking TNF- α increased susceptibility to *Histoplasma capsulatum* infection and induced a population of CD4⁺CD25⁺ T cells possessing IL-10-dependent suppressive function in mice (121). Besides, TNF- α can inhibit TGF- β -driven pTreg induction from Foxp3⁺ Teffs in an EAE model (122). Finally, it has been pointed out that soluble TNF- α and membrane-bound TNF- α may differently affect the process of pTreg induction in vitro (123).

3. Concluding remarks

We focused our review on three major cytokines that regulate different aspects of Treg biology, namely IL-2, TGF- β and TNF- α , because they are of great fundamental and clinical importance. Indeed, immunotherapies based on a better knowledge of the impact of cytokines

on Treg biology are emerging (46, 47, 116). However, we need to better understand the division of labor of pTreg and tTreg in the fine control of the immune response. It is not yet clear if each cell type acts preferentially at different localizations, at different timepoints during the initiation, expansion, contraction, and memory generation of the immune response, or has specific targets for suppression. Also, we need to dissect the specific cytokine requirements for tTreg and pTreg generation, homeostasis and function, which are sometimes distinct and sometimes shared. Only with that information at hands will the extraordinary power of tTregs and pTregs be fully exploited in safe and effective clinical applications.

Figure legend

Figure 1. Exogenous short-term administration of IL-2 does not induce Tregs. 10-12-week old CD45.2⁺ NOD mice were adoptively transferred with 0,5 10⁶ CD4⁺GFP⁻ T cells flow sorted from CD45.1⁺ FoxP3-GFP NOD mice (42) and treated daily with PBS, 25,000 or 250,000 IU rhIL-2 during 5 days and analyzed 2 h after the last injection. Representative dot plots of Foxp3 expression among host (CD45.1⁻) and transferred (CD45.1⁺) CD4⁺ T cells in the pancreatic lymph nodes (PLN, top panel) and islets (bottom panel). Data are representative of 2 to 3 mice per group.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments

J.G, L.P and A.B were supported by the Ministère de la Recherche Française and B.Z. by the Université Pierre et Marie Curie, Paris 06. This work was supported by the EFSD/JDRF/NN 2011 and INSERM/ DGOS 2011 (to E.P.), and by ANRS (to G.M.).

References

1. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* (2003) **4**(4):330-6. doi: 10.1038/ni904. PubMed PMID: 12612578.
2. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* (2003) **299**(5609):1057-61. doi: 10.1126/science.1079490. PubMed PMID: 12522256.
3. Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J Exp Med* (2005) **202**(7):901-6. doi: 10.1084/jem.20050784. PubMed PMID: 16203863; PubMed Central PMCID: PMC2213175.
4. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, et al. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* (2007) **445**(7129):771-5. doi: 10.1038/nature05543. PubMed PMID: 17220874.
5. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, et al. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* (2007) **27**(5):786-800. doi: 10.1016/j.immuni.2007.09.010. PubMed PMID: 18024188.
6. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, et al. Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol* (2007) **8**(4):359-68. doi: 10.1038/ni1445. PubMed PMID: 17273171.
7. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, et al. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol* (2006) **18**(8):1197-209. doi: 10.1093/intimm/dxl060. PubMed PMID: 16772372.
8. Ohkura N, Hamaguchi M, Morikawa H, Sugimura K, Tanaka A, Ito Y, et al. T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. *Immunity* (2012) **37**(5):785-99. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.010. PubMed PMID: 23123060.
9. Ohkura N, Kitagawa Y, Sakaguchi S. Development and Maintenance of Regulatory T cells. *Immunity* (2013) **38**(3):414-23. doi: 10.1016/j.immuni.2013.03.002. PubMed PMID: 23521883.
10. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* (1995) **155**(3):1151-64. PubMed PMID: 7636184.
11. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* (2001) **2**(4):301-6. doi: 10.1038/86302. PubMed PMID: 11276200.
12. Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol* (2006) **7**(4):401-10. doi: 10.1038/ni1318. PubMed PMID: 16532000.
13. Josefowicz SZ, Niec RE, Kim HY, Treuting P, Chinen T, Zheng Y, et al. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature* (2012) **482**(7385):395-9. doi: 10.1038/nature10772. PubMed PMID: 22318520; PubMed Central PMCID: PMC3485072.
14. Itoh M, Takahashi T, Sakaguchi N, Kuniyasu Y, Shimizu J, Otsuka F, et al. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a

- key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol* (1999) **162**(9):5317-26. PubMed PMID: 10228007.
15. D'Cruz LM, Klein L. Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling. *Nat Immunol* (2005) **6**(11):1152-9. doi: 10.1038/ni1264. PubMed PMID: 16227983.
 16. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol* (2005) **6**(11):1142-51. doi: 10.1038/ni1263. PubMed PMID: 16227984.
 17. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* (2007) **178**(1):280-90. PubMed PMID: 17182565.
 18. Soper DM, Kasprowitz DJ, Ziegler SF. IL-2Rbeta links IL-2R signaling with Foxp3 expression. *Eur J Immunol* (2007) **37**(7):1817-26. doi: 10.1002/eji.200737101. PubMed PMID: 17559173.
 19. Mouly E, Chemin K, Nguyen HV, Chopin M, Mesnard L, Leite-de-Moraes M, et al. The Ets-1 transcription factor controls the development and function of natural regulatory T cells. *J Exp Med* (2010) **207**(10):2113-25. doi: 10.1084/jem.20092153. PubMed PMID: 20855499; PubMed Central PMCID: PMC2947068.
 20. Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, et al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* (2007) **109**(10):4368-75. doi: 10.1182/blood-2006-11-055756. PubMed PMID: 17227828; PubMed Central PMCID: PMC1885496.
 21. Zorn E, Nelson EA, Mohseni M, Porcheray F, Kim H, Litsa D, et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood* (2006) **108**(5):1571-9. doi: 10.1182/blood-2006-02-004747. PubMed PMID: 16645171; PubMed Central PMCID: PMC1895505.
 22. Toker A, Engelbert D, Garg G, Polansky JK, Floess S, Miyao T, et al. Active Demethylation of the Foxp3 Locus Leads to the Generation of Stable Regulatory T Cells within the Thymus. *J Immunol* (2013) **190**(7):3180-8. doi: 10.4049/jimmunol.1203473. PubMed PMID: 23420886.
 23. Lio CW, Hsieh CS. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity* (2008) **28**(1):100-11. doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.021. PubMed PMID: 18199417; PubMed Central PMCID: PMC2248212.
 24. Burchill MA, Yang J, Vang KB, Moon JJ, Chu HH, Lio CW, et al. Linked T cell receptor and cytokine signaling govern the development of the regulatory T cell repertoire. *Immunity* (2008) **28**(1):112-21. doi: 10.1016/j.immuni.2007.11.022. PubMed PMID: 18199418; PubMed Central PMCID: PMC2430111.
 25. Goldstein JD, Balderas RS, Marodon G. Continuous activation of the CD122/STAT-5 signaling pathway during selection of antigen-specific regulatory T cells in the murine thymus. *PLoS One* (2011) **6**(4):e19038. doi: 10.1371/journal.pone.0019038. PubMed PMID: 21541329; PubMed Central PMCID: PMC3082544.
 26. Sadlack B, Lohler J, Schorle H, Klebb G, Haber H, Sickel E, et al. Generalized autoimmune disease in interleukin-2-deficient mice is triggered by an uncontrolled activation and proliferation of CD4+ T cells. *Eur J Immunol* (1995) **25**(11):3053-9. doi: 10.1002/eji.1830251111. PubMed PMID: 7489743.
 27. Sadlack B, Merz H, Schorle H, Schimpl A, Feller AC, Horak I. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene. *Cell* (1993) **75**(2):253-61. PubMed PMID: 8402910.

28. Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science* (1995) **268**(5216):1472-6. PubMed PMID: 7770771.
29. Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity* (1995) **3**(4):521-30. PubMed PMID: 7584142.
30. Smith KA, Baker PE, Gillis S, Ruscetti FW. Functional and molecular characteristics of T-cell growth factor. *Mol Immunol* (1980) **17**(5):579-89. PubMed PMID: 6971398.
31. Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* (2005) **201**(5):723-35. doi: 10.1084/jem.20041982. PubMed PMID: 15753206; PubMed Central PMCID: PMC2212841.
32. Murawski MR, Litherland SA, Clare-Salzler MJ, Davoodi-Semiromi A. Upregulation of Foxp3 expression in mouse and human Treg is IL-2/STAT5 dependent: implications for the NOD STAT5B mutation in diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci* (2006) **1079**:198-204. doi: 10.1196/annals.1375.031. PubMed PMID: 17130555.
33. Passerini L, Allan SE, Battaglia M, Di Nunzio S, Alstad AN, Levings MK, et al. STAT5-signaling cytokines regulate the expression of FOXP3 in CD4+CD25+ regulatory T cells and CD4+CD25- effector T cells. *Int Immunol* (2008) **20**(3):421-31. doi: 10.1093/intimm/dxn002. PubMed PMID: 18270368.
34. Rubtsov YP, Niec RE, Josefowicz S, Li L, Darce J, Mathis D, et al. Stability of the regulatory T cell lineage in vivo. *Science* (2010) **329**(5999):1667-71. doi: 10.1126/science.1191996. PubMed PMID: 20929851.
35. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* (2006) **126**(2):375-87. doi: 10.1016/j.cell.2006.05.042. PubMed PMID: 16873067.
36. Almeida AR, Zaragoza B, Freitas AA. Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *J Immunol* (2006) **177**(1):192-200. PubMed PMID: 16785514.
37. Bottini N, Musumeci L, Alonso A, Rahmouni S, Nika K, Rostamkhani M, et al. A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes. *Nat Genet* (2004) **36**(4):337-8. doi: 10.1038/ng1323. PubMed PMID: 15004560.
38. Todd JA, Walker NM, Cooper JD, Smyth DJ, Downes K, Plagnol V, et al. Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes. *Nat Genet* (2007) **39**(7):857-64. doi: 10.1038/ng2068. PubMed PMID: 17554260; PubMed Central PMCID: PMC2492393.
39. Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, et al. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* (2005) **76**(5):773-9. doi: 10.1086/429843. PubMed PMID: 15776395; PubMed Central PMCID: PMC1199367.
40. Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, Howlett S, Hunter K, Garner VE, et al. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet* (2007) **39**(3):329-37. doi: 10.1038/ng1958. PubMed PMID: 17277778; PubMed Central PMCID: PMC2886969.
41. Dinh TN, Kyaw TS, Kanellakis P, To K, Tipping P, Toh BH, et al. Cytokine therapy with interleukin-2/anti-interleukin-2 monoclonal antibody complexes expands CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells and attenuates development and progression of atherosclerosis. *Circulation* (2012) **126**(10):1256-66. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.099044. PubMed PMID: 22851544.

42. Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* (2010) **207**(9):1871-8. doi: 10.1084/jem.20100209. PubMed PMID: 20679400; PubMed Central PMCID: PMC2931175.
43. Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* (2008) **28**(5):687-97. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.016. PubMed PMID: 18468463; PubMed Central PMCID: PMC2394854.
44. Webster KE, Walters S, Kohler RE, Mrkvan T, Boyman O, Surh CD, et al. In vivo expansion of T reg cells with IL-2-mAb complexes: induction of resistance to EAE and long-term acceptance of islet allografts without immunosuppression. *J Exp Med* (2009) **206**(4):751-60. doi: 10.1084/jem.20082824. PubMed PMID: 19332874; PubMed Central PMCID: PMC2715127.
45. Wilson MS, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson RW, Cheever A, Wynn TA. Suppression of murine allergic airway disease by IL-2:anti-IL-2 monoclonal antibody-induced regulatory T cells. *J Immunol* (2008) **181**(10):6942-54. PubMed PMID: 18981114; PubMed Central PMCID: PMC2706157.
46. Koreth J, Matsuoka K, Kim HT, McDonough SM, Bindra B, Alyea EP, 3rd, et al. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N Engl J Med* (2011) **365**(22):2055-66. doi: 10.1056/NEJMoa1108188. PubMed PMID: 22129252.
47. Saadoun D, Rosenzweig M, Joly F, Six A, Carrat F, Thibault V, et al. Regulatory T-cell responses to low-dose interleukin-2 in HCV-induced vasculitis. *N Engl J Med* (2011) **365**(22):2067-77. doi: 10.1056/NEJMoa1105143. PubMed PMID: 22129253.
48. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* (2005) **201**(7):1061-7. doi: 10.1084/jem.20042276. PubMed PMID: 15809351; PubMed Central PMCID: PMC2213134.
49. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, et al. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* (1992) **359**(6397):693-9. doi: 10.1038/359693a0. PubMed PMID: 1436033.
50. Gorelik L, Flavell RA. Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* (2000) **12**(2):171-81. PubMed PMID: 10714683.
51. Leveen P, Larsson J, Ehinger M, Cilio CM, Sundler M, Sjostrand LJ, et al. Induced disruption of the transforming growth factor beta type II receptor gene in mice causes a lethal inflammatory disorder that is transplantable. *Blood* (2002) **100**(2):560-8. PubMed PMID: 12091349.
52. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* (2006) **25**(3):455-71. doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.011. PubMed PMID: 16973386.
53. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* (2008) **9**(6):632-40. doi: 10.1038/ni.1607. PubMed PMID: 18438410.
54. Marie JC, Liggitt D, Rudensky AY. Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* (2006) **25**(3):441-54. doi: 10.1016/j.immuni.2006.07.012. PubMed PMID: 16973387.

55. Fahlen L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* (2005) **201**(5):737-46. doi: 10.1084/jem.20040685. PubMed PMID: 15753207; PubMed Central PMCID: PMC2212836.
56. Zhang N, Bevan MJ. TGF-beta signaling to T cells inhibits autoimmunity during lymphopenia-driven proliferation. *Nat Immunol* (2012) **13**(7):667-73. doi: 10.1038/ni.2319. PubMed PMID: 22634866; PubMed Central PMCID: PMC3380154.
57. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* (2008) **9**(2):194-202. doi: 10.1038/ni1549. PubMed PMID: 18157133.
58. Zheng Y, Josefowicz S, Chaudhry A, Peng XP, Forbush K, Rudensky AY. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature* (2010) **463**(7282):808-12. doi: 10.1038/nature08750. PubMed PMID: 20072126; PubMed Central PMCID: PMC2884187.
59. Chen X, Wu X, Zhou Q, Howard OM, Netea MG, Oppenheim JJ. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T. cell phenotype in the inflammatory environment. *J Immunol* (2013) **190**(3):1076-84. doi: 10.4049/jimmunol.1202659. PubMed PMID: 23277487; PubMed Central PMCID: PMC3552130.
60. Furtado GC, Curotto de Lafaille MA, Kutchukhidze N, Lafaille JJ. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* (2002) **196**(6):851-7. PubMed PMID: 12235217; PubMed Central PMCID: PMC2194060.
61. Haribhai D, Williams JB, Jia S, Nickerson D, Schmitt EG, Edwards B, et al. A requisite role for induced regulatory T cells in tolerance based on expanding antigen receptor diversity. *Immunity* (2011) **35**(1):109-22. doi: 10.1016/j.immuni.2011.03.029. PubMed PMID: 21723159; PubMed Central PMCID: PMC3295638.
62. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* (2012) **30**:531-64. doi: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623. PubMed PMID: 22224781.
63. Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* (2009) **30**(5):626-35. doi: 10.1016/j.immuni.2009.05.002. PubMed PMID: 19464985.
64. Ertelt JM, Rowe JH, Johanss TM, Lai JC, McLachlan JB, Way SS. Selective priming and expansion of antigen-specific Foxp3- CD4+ T cells during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* (2009) **182**(5):3032-8. doi: 10.4049/jimmunol.0803402. PubMed PMID: 19234199; PubMed Central PMCID: PMC2677098.
65. Robertson SJ, Messer RJ, Carmody AB, Hasenkrug KJ. In vitro suppression of CD8+ T cell function by Friend virus-induced regulatory T cells. *J Immunol* (2006) **176**(6):3342-9. PubMed PMID: 16517701.
66. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* (2007) **178**(5):2883-92. PubMed PMID: 17312132.
67. Nishikawa H, Kato T, Tanida K, Hiasa A, Tawara I, Ikeda H, et al. CD4+ CD25+ T cells responding to serologically defined autoantigens suppress antitumor immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) **100**(19):10902-6. doi: 10.1073/pnas.1834479100. PubMed PMID: 12947044; PubMed Central PMCID: PMC196900.
68. Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, et al. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* (2007) **204**(8):1757-64. doi: 10.1084/jem.20070590. PubMed PMID: 17620361; PubMed Central PMCID: PMC2118683.

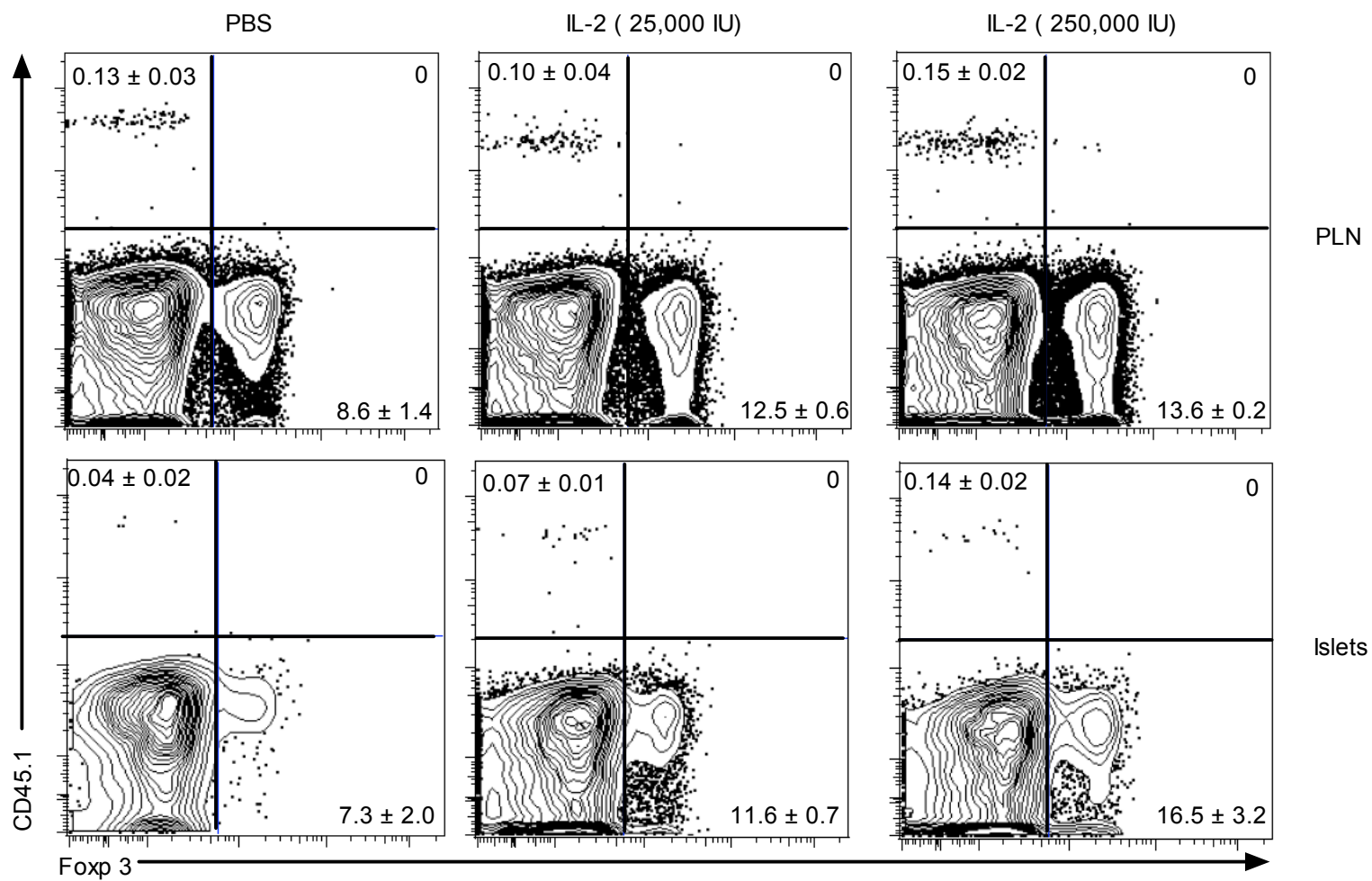
69. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest* (2005) **115**(7):1923-33. doi: 10.1172/JCI24487. PubMed PMID: 15937545; PubMed Central PMCID: PMC1142115.
70. Sun CM, Hall JA, Blank RB, Bouladoux N, Oukka M, Mora JR, et al. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med* (2007) **204**(8):1775-85. doi: 10.1084/jem.20070602. PubMed PMID: 17620362; PubMed Central PMCID: PMC2118682.
71. Yamazaki S, Bonito AJ, Spisek R, Dhodapkar M, Inaba K, Steinman RM. Dendritic cells are specialized accessory cells along with TGF- for the differentiation of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells from peripheral Foxp3 precursors. *Blood* (2007) **110**(13):4293-302. doi: 10.1182/blood-2007-05-088831. PubMed PMID: 17699744; PubMed Central PMCID: PMC2234777.
72. Goubier A, Dubois B, Gheit H, Joubert G, Villard-Truc F, Asselin-Paturel C, et al. Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* (2008) **29**(3):464-75. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.017. PubMed PMID: 18789731; PubMed Central PMCID: PMC3545652.
73. Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, et al. Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* (2006) **7**(6):652-62. doi: 10.1038/ni1333. PubMed PMID: 16633346.
74. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* (2005) **6**(12):1219-27. doi: 10.1038/ni1265. PubMed PMID: 16244650.
75. Yamazaki S, Dudziak D, Heidkamp GF, Fiorese C, Bonito AJ, Inaba K, et al. CD8+ CD205+ splenic dendritic cells are specialized to induce Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* (2008) **181**(10):6923-33. PubMed PMID: 18981112; PubMed Central PMCID: PMC2814590.
76. Kaplan DH, Li MO, Jenison MC, Shlomchik WD, Flavell RA, Shlomchik MJ. Autocrine/paracrine TGFbeta1 is required for the development of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* (2007) **204**(11):2545-52. doi: 10.1084/jem.20071401. PubMed PMID: 17938236; PubMed Central PMCID: PMC2118472.
77. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* (2003) **198**(12):1875-86. doi: 10.1084/jem.20030152. PubMed PMID: 14676299; PubMed Central PMCID: PMC2194145.
78. Walker MR, Kaspirowicz DJ, Gersuk VH, Benard A, Van Landeghen M, Buckner JH, et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J Clin Invest* (2003) **112**(9):1437-43. doi: 10.1172/JCI19441. PubMed PMID: 14597769; PubMed Central PMCID: PMC228469.
79. Grainger JR, Smith KA, Hewitson JP, McSorley HJ, Marcus Y, Filbey KJ, et al. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway. *J Exp Med* (2010) **207**(11):2331-41. doi: 10.1084/jem.20101074. PubMed PMID: 20876311; PubMed Central PMCID: PMC2964568.
80. Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4+Foxp3+ cells. *J Exp Med* (2008) **205**(3):565-74. doi: 10.1084/jem.20071477. PubMed PMID: 18283119; PubMed Central PMCID: PMC2275380.
81. Sauer S, Bruno L, Hertweck A, Finlay D, Leleu M, Spivakov M, et al. T cell receptor signaling controls Foxp3 expression via PI3K, Akt, and mTOR. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2008) **105**(22):7797-802. doi: 10.1073/pnas.0800928105. PubMed PMID: 18509048; PubMed Central PMCID: PMC2409380.

82. Strainic MG, Shevach EM, An F, Lin F, Medof ME. Absence of signaling into CD4(+) cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF-beta1 signaling and induction of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat Immunol* (2013) **14**(2):162-71. doi: 10.1038/ni.2499. PubMed PMID: 23263555.
83. Xu L, Kitani A, Strober W. Molecular mechanisms regulating TGF-beta-induced Foxp3 expression. *Mucosal Immunol* (2010) **3**(3):230-8. doi: 10.1038/mi.2010.7. PubMed PMID: 20404810.
84. Karman J, Jiang JL, Gumlaw N, Zhao H, Campos-Rivera J, Sancho J, et al. Ligation of cytotoxic T lymphocyte antigen-4 to T cell receptor inhibits T cell activation and directs differentiation into Foxp3+ regulatory T cells. *J Biol Chem* (2012) **287**(14):11098-107. doi: 10.1074/jbc.M111.283705. PubMed PMID: 22337882; PubMed Central PMCID: PMC3322849.
85. Maddur MS, Miossec P, Kaveri SV, Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* (2012) **181**(1):8-18. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.03.044. PubMed PMID: 22640807.
86. Jabeen R, Kaplan MH. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr Opin Immunol* (2012) **24**(3):303-7. doi: 10.1016/j.coi.2012.02.001. PubMed PMID: 22365614; PubMed Central PMCID: PMC3368035.
87. Flanders KC, Roberts AB. TGF-beta. In: *Oppenheim JJ, Feldmann M (eds) Cytokine Reference, Vol 1 Academic Press: San Diego, CA* (2001):719-46.
88. Prud'homme GJ. Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations. *Lab Invest* (2007) **87**(11):1077-91. doi: 10.1038/labinvest.3700669. PubMed PMID: 17724448.
89. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* (2007) **178**(7):4022-6. PubMed PMID: 17371955.
90. Zheng SG, Wang J, Wang P, Gray JD, Horwitz DA. IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells. *J Immunol* (2007) **178**(4):2018-27. PubMed PMID: 17277105.
91. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* (2007) **26**(3):371-81. doi: 10.1016/j.immuni.2007.02.009. PubMed PMID: 17363300.
92. Chen Q, Kim YC, Laurence A, Punkosdy GA, Shevach EM. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF-beta-induced Foxp3+ T cells in vivo. *J Immunol* (2011) **186**(11):6329-37. doi: 10.4049/jimmunol.1100061. PubMed PMID: 21525380; PubMed Central PMCID: PMC3098943.
93. Nykjaer A, Moller B, Todd RF, 3rd, Christensen T, Andreasen PA, Gliemann J, et al. Urokinase receptor. An activation antigen in human T lymphocytes. *J Immunol* (1994) **152**(2):505-16. PubMed PMID: 8283034.
94. Odekon LE, Blasi F, Rifkin DB. Requirement for receptor-bound urokinase in plasmin-dependent cellular conversion of latent TGF-beta to TGF-beta. *J Cell Physiol* (1994) **158**(3):398-407. doi: 10.1002/jcp.1041580303. PubMed PMID: 8126064.
95. Knoechel B, Lohr J, Kahn E, Bluestone JA, Abbas AK. Sequential development of interleukin 2-dependent effector and regulatory T cells in response to endogenous systemic antigen. *J Exp Med* (2005) **202**(10):1375-86. doi: 10.1084/jem.20050855. PubMed PMID: 16287710; PubMed Central PMCID: PMC2212975.
96. Shin HJ, Baker J, Leveson-Gower DB, Smith AT, Sega EI, Negrin RS. Rapamycin and IL-2 reduce lethal acute graft-versus-host disease associated with increased expansion of donor type CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Blood* (2011) **118**(8):2342-50. doi: 10.1182/blood-2010-10-313684. PubMed PMID: 21734238.

97. Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the *foxp3* locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* (2007) **5**(2):e38. doi: 10.1371/journal.pbio.0050038. PubMed PMID: 17298177; PubMed Central PMCID: PMC1783672.
98. Miyao T, Floess S, Setoguchi R, Luche H, Fehling HJ, Waldmann H, et al. Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* (2012) **36**(2):262-75. doi: 10.1016/j.immuni.2011.12.012. PubMed PMID: 22326580.
99. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez-Llordella M, Ashby M, et al. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* (2009) **10**(9):1000-7. doi: 10.1038/ni.1774. PubMed PMID: 19633673; PubMed Central PMCID: PMC2729804.
100. Duarte JH, Zelenay S, Bergman ML, Martins AC, Demengeot J. Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions. *Eur J Immunol* (2009) **39**(4):948-55. doi: 10.1002/eji.200839196. PubMed PMID: 19291701.
101. Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert EA, Hall JA, Chou D, Dos Santos L, et al. Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection. *Immunity* (2009) **31**(5):772-86. doi: 10.1016/j.immuni.2009.10.001. PubMed PMID: 19896394; PubMed Central PMCID: PMC2814877.
102. Komatsu N, Mariotti-Ferrandiz ME, Wang Y, Malissen B, Waldmann H, Hori S. Heterogeneity of natural Foxp3+ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) **106**(6):1903-8. doi: 10.1073/pnas.0811556106. PubMed PMID: 19174509; PubMed Central PMCID: PMC2644136.
103. Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. *Eur J Immunol* (2008) **38**(6):1654-63. doi: 10.1002/eji.200838105. PubMed PMID: 18493985.
104. Wohlfert EA, Grainger JR, Bouladoux N, Konkel JE, Oldenhove G, Ribeiro CH, et al. GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J Clin Invest* (2011) **121**(11):4503-15. doi: 10.1172/JCI57456. PubMed PMID: 21965331; PubMed Central PMCID: PMC3204837.
105. Wang Y, Su MA, Wan YY. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity* (2011) **35**(3):337-48. doi: 10.1016/j.immuni.2011.08.012. PubMed PMID: 21924928; PubMed Central PMCID: PMC3182399.
106. Chen X, Baumel M, Mannel DN, Howard OM, Oppenheim JJ. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J Immunol* (2007) **179**(1):154-61. PubMed PMID: 17579033.
107. Hamano R, Huang J, Yoshimura T, Oppenheim JJ, Chen X. TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *Eur J Immunol* (2011) **41**(7):2010-20. doi: 10.1002/eji.201041205. PubMed PMID: 21491419.
108. Chopra M, Riedel SS, Biehl M, Krieger S, von Krosigk V, Bauerlein CA, et al. Tumor necrosis factor receptor 2-dependent homeostasis of regulatory T cells as a player in TNF-induced experimental metastasis. *Carcinogenesis* (2013). doi: 10.1093/carcin/bgt038. PubMed PMID: 23385062.
109. van Mierlo GJ, Scherer HU, Hameetman M, Morgan ME, Flierman R, Huizinga TW, et al. Cutting edge: TNFR-shedding by CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators. *J Immunol* (2008) **180**(5):2747-51. PubMed PMID: 18292492.

110. Nagar M, Jacob-Hirsch J, Vernitsky H, Berkun Y, Ben-Horin S, Amariglio N, et al. TNF activates a NF-kappaB-regulated cellular program in human CD45RA- regulatory T cells that modulates their suppressive function. *J Immunol* (2010) **184**(7):3570-81. doi: 10.4049/jimmunol.0902070. PubMed PMID: 20181891.
111. Valencia X, Stephens G, Goldbach-Mansky R, Wilson M, Shevach EM, Lipsky PE. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* (2006) **108**(1):253-61. doi: 10.1182/blood-2005-11-4567. PubMed PMID: 16537805; PubMed Central PMCID: PMC1895836.
112. Zanin-Zhorov A, Ding Y, Kumari S, Attur M, Hippen KL, Brown M, et al. Protein kinase C-theta mediates negative feedback on regulatory T cell function. *Science* (2010) **328**(5976):372-6. doi: 10.1126/science.1186068. PubMed PMID: 20339032; PubMed Central PMCID: PMC2905626.
113. Chen X, Oppenheim JJ. TNF-alpha: an activator of CD4+FoxP3+TNFR2+ regulatory T cells. *Curr Dir Autoimmun* (2010) **11**:119-34. doi: 10.1159/000289201. PubMed PMID: 20173391.
114. Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, Billiard F, Goldstein JD, Gregoire S, et al. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* (2010) **120**(12):4558-68. doi: 10.1172/JCI42945. PubMed PMID: 21099113; PubMed Central PMCID: PMC2993590.
115. Housley WJ, Adams CO, Nichols FC, Puddington L, Lingenheld EG, Zhu L, et al. Natural but not inducible regulatory T cells require TNF-alpha signaling for in vivo function. *J Immunol* (2011) **186**(12):6779-87. doi: 10.4049/jimmunol.1003868. PubMed PMID: 21572024.
116. Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* (2010) **10**(5):301-16. doi: 10.1038/nri2761. PubMed PMID: 20414204.
117. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp Med* (2004) **200**(3):277-85. doi: 10.1084/jem.20040165. PubMed PMID: 15280421; PubMed Central PMCID: PMC2211983.
118. Nadkarni S, Mauri C, Ehrenstein MR. Anti-TNF-alpha therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF-beta. *J Exp Med* (2007) **204**(1):33-9. doi: 10.1084/jem.20061531. PubMed PMID: 17200409; PubMed Central PMCID: PMC2118431.
119. Nie H, Zheng Y, Li R, Guo TB, He D, Fang L, et al. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF-alpha in rheumatoid arthritis. *Nat Med* (2013) **19**(3):322-8. doi: 10.1038/nm.3085. PubMed PMID: 23396208.
120. Biton J, Semerano L, Delavallee L, Lemeiter D, Laborie M, Grouard-Vogel G, et al. Interplay between TNF and regulatory T cells in a TNF-driven murine model of arthritis. *J Immunol* (2011) **186**(7):3899-910. doi: 10.4049/jimmunol.1003372. PubMed PMID: 21346237.
121. Deepe GS, Jr., Gibbons RS. TNF-alpha antagonism generates a population of antigen-specific CD4+CD25+ T cells that inhibit protective immunity in murine histoplasmosis. *J Immunol* (2008) **180**(2):1088-97. PubMed PMID: 18178849; PubMed Central PMCID: PMC2447823.
122. Zhang Q, Cui F, Fang L, Hong J, Zheng B, Zhang JZ. TNF-alpha impairs differentiation and function of TGF-beta-induced Treg cells in autoimmune diseases through Akt and Smad3 signaling pathway. *J Mol Cell Biol* (2013) **5**(2):85-98. doi: 10.1093/jmcb/mjs063. PubMed PMID: 23243069.
123. Kleijwegt FS, Laban S, Duinkerken G, Joosten AM, Zaldumbide A, Nikolic T, et al. Critical role for TNF in the induction of human antigen-specific regulatory T cells by

tolerogenic dendritic cells. *J Immunol* (2010) **185**(3):1412-8. doi: 10.4049/jimmunol.1000560.
PubMed PMID: 20574005.



Stimulation des lymphocytes T régulateurs chez la souris dans un contexte inflammatoire comme le diabète auto-immun.

Les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Treg) sont des acteurs majeurs du maintien de la tolérance au soi, participants au contrôle de nombreuses maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques. De nombreuses études ont décrit les mécanismes de suppression exercés par les Treg sur les lymphocytes T conventionnels (Tconv) mais très peu se sont intéressées à l'effet des Tconv sur les Treg. Nous avons étudié l'impact de l'activation des Tconv sur l'homéostasie des Treg dans deux contextes inflammatoires, un modèle de diabète de type 1 (DT1) et un modèle d'inflammation induite par un adjuvant. Dans le contexte diabétique, le transfert de Tconv spécifiques d'un antigène d'îlot pancréatique augmente fortement la prolifération et la fonction suppressive des Treg de même spécificité dans les îlots pancréatiques et leurs ganglions drainants. Ce « *boost* » des Treg induit par les Tconv activés a un impact physiologique. En effet, lorsque des Tconv spécifiques d'un antigène d'îlots pancréatiques sont transférés seuls, ils induisent un diabète. En revanche, lorsque ces mêmes Tconv sont co-transférés avec des Treg de même spécificité, ils protègent les souris de cette maladie. L'étude du mécanisme cellulaire de ce phénomène montre une implication des cellules dendritiques plasmacytoïdes. D'un point de vue moléculaire, nos résultats montrent que le boost des Treg par des Tconv est dépendant du TNF α et d'OX40, mais pas de l'IL-2, dans ce modèle de DT1. Dans le 2^{ème} contexte, celui d'une forte inflammation induite par l'injection de l'adjuvant complet de Freund, l'activation des Tconv augmente aussi la prolifération des Treg. Ce 2^{ème} type de boost est également dépendant du TNF α mais cette fois-ci également de l'IL-2. Ces données montrent que les Tconv pourraient de façon paradoxale avoir des effets immuno-régulateurs en stimulant les Treg par différents mécanismes selon le contexte.

Il est établi que l'IL-2 est essentiel pour la survie, la prolifération et la différenciation des Treg. L'administration de cette cytokine pourrait donc avoir un effet thérapeutique dans les maladies auto-immunes comme le TD1. Dans le modèle de diabète spontané de la souris *non-obese diabetic* (NOD), nous avons montré que l'administration d'une faible dose d'IL-2 pendant 5 jours permet la rémission de la maladie dans 60% des cas. Ce traitement semble agir spécifiquement au niveau des îlots pancréatiques, en augmentant la proportion et la capacité suppressive des Treg. De façon intéressante, l'injection d'une dose 10 fois plus élevée d'IL-2 accélère l'incidence du diabète. Dans le but d'améliorer l'effet curatif de faibles doses d'IL-2, nous avons combiné ce traitement avec la rapamycine (Rapa), immunosuppresseur utilisé en transplantation. De façon inattendue, la présence de Rapa inhibe l'effet thérapeutique de l'IL-2. De plus, chez des souris dont la rémission du diabète a été obtenue par injection d'IL-2, l'administration de Rapa annule l'effet bénéfique de l'IL-2 et rend les souris rapidement diabétiques. Il semble que cet immunosuppresseur altère la capacité suppressive des Treg et bloquerait leur capacité à migrer dans le pancréas.

L'ensemble de ce travail met en évidence un nouveau mécanisme de rétrocontrôle de la réponse immune via un *boost* des Treg par les Tconv. Nous montrons également un effet curatif de l'administration de l'IL-2 dans le diabète, inhibé par l'administration de Rapa.